

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JANAINA GOMES HEUKO

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE DERIVADO AMINO CARBOXILADO DA
AGAROSE**

CURITIBA

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JANAINA GOMES HEUKO

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE DERIVADO AMINO CARBOXILADO DA
AGAROSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências - Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Diogo R. Bazan Ducatti

Co-orientadores: Prof. Dr. Alan Guilherme Gonçalves e Prof^a. Dra. Maria Eugênia Duarte Noseda

CURITIBA

2015

Heuko, Janaina Gomes

Síntese e caracterização de derivado amino carboxilado da agarose. /
Janaina Gomes Heuko. – Curitiba, 2015.
100f.: il. ; 30cm.

Orientador: Diogo Ricardo Bazan Ducatti

Coorientador: Alan Guilherme Gonçalves

Coorientadora: Maria Eugênia Duarte Nosedá

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

1. Polissacarídeos. 2. Alga vermelha. 3. Sefarose. I. Título II. Ducatti,
Diogo Ricardo Bazan. III. Gonçalves, Alan Guilherme. IV. Nosedá, Maria
Eugênia Duarte. V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

CDD (20. ed.) 574.192

TERMO DE APROVAÇÃO

JANAINA GOMES HEUKO

Síntese e caracterização de derivado amino carboxilado da agarose

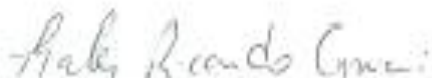
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Diogo Ricardo B. Ducatti – Orientador
Departamento de Bioquímica, UFPR



Prof. Dr. Clayton Fernandes de Souza
PUC-PR



Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani
Departamento de Bioquímica, UFPR

Curitiba, 25 de março de 2015.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente e acima de tudo agradeço aos meus pais que sempre me apoiaram e incentivaram. Obrigada por todas as oportunidades, por todo amor e dedicação.

A minha irmã e melhor amiga, Joyce, pelo apoio, pela amizade, por sempre estar presente, por acreditar em mim. Obrigada por tudo!

A toda a minha família e amigos que contribuíram com tantos momentos de alegria e que sempre torceram por mim.

Ao Prof. Dr. Diogo Ducatti pela excelente orientação, por toda a ajuda e paciência, pelo incentivo e pela dedicação em me ensinar e acompanhar.

Aos meus co-orientadores Prof. Dr. Alan Gonçalves e Prof^a Dra. Maria Eugênia Duarte Nosedá e também ao Prof. Dr. Miguel Nosedá por todas as sugestões e contribuições.

A banca examinadora, composta pelo Prof. Dr. Thales Cipriani e Prof. Dr. Clayton Fernandes, pela avaliação do trabalho e as ótimas sugestões.

Aos colegas dos laboratórios 248 e E3 por todo o auxílio, empréstimos e ajuda.

Ao Centro de RMN do Departamento de Bioquímica da UFPR pelas análises.

Às técnicas Dona Teresa e Fabiana pelo empréstimo de diversos materiais e aparelhos, além de muitos e muitos litros de água destilada.

A todos os meus colegas do departamento de bioquímica, principalmente aos colegas da turma de mestrado Willian, Glauco, Vanessa, Helyn e em especial a Gislaine por todas as discussões que contribuíram para este projeto, por tantos momentos de alegria e pela amizade.

Às colegas do Departamento de Ciências Farmacêuticas: Jaqueline, Lais, Juliana e Stephanie, pelas diversas contribuições e pelos momentos de descontração.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências (Bioquímica) da UFPR.

À CAPES, Fundação Araucária, a PRONEX-Carboidratos e CNPq pelo apoio financeiro.

Só fazemos melhor aquilo que repetidamente insistimos em melhorar. A busca da excelência não deve ser um objetivo, e sim um hábito.

(Aristóteles)

RESUMO

Polissacarídeos de algas vermelhas (agaranas e carragenanas) têm atraído muita atenção devido à suas diversas aplicações e abundante estoque marinho. O objetivo deste trabalho foi realizar a modificação seletiva de C6 da unidade de β -D-Galp para a síntese do derivado amino carboxilado da agarose, através de uma síntese em quatro etapas. Para isso, foi realizada a inserção dos grupamentos tosila, azido, amino e carboxila nesta posição do polissacarídeo gerando derivados da agarose que possuem potencial no desenvolvimento de materiais com aplicação tecnológica e farmacêutica, tais como na área biotecnológica, como suporte para imobilização de enzimas, na indústria química em síntese orgânica e na área biomédica na confecção de biomateriais. Além disso, foi realizada a caracterização química de todos os derivados sintetizados. A primeira reação da síntese foi a reação de tosilação. Esta reação foi realizada em meio básico, assim, primeiramente a agarose foi submetida à reação com NaBH_4 para redução de seus terminais redutores. As reações preparativas de tosilação, em condições otimizadas, geraram dois derivados tosila da agarose com grau de substituição por grupo tosila de 0,25 e 0,91 (frações **2a** e **2b**), respectivamente e rendimentos de 97% para ambos os derivados. O derivado **2b** apresentou preferência para a posição C6 da unidade de β -D-Galp, apresentando um grau de substituição de 0,57 para esta posição. Os derivados azido da agarose foram sintetizados, em escala preparativa, em condições otimizadas, com um rendimento de 84% e 52% (frações **3a** e **3b**). Para a amostra **3b** o grau de substituição pelo grupo azido foi de 0,50 para a posição C6 da unidade de β -D-Galp. Os derivados amino foram sintetizados através da reação de Staudinger, utilizando trifenilfosfina e água. O derivado amino **4a** e o derivado **4b** apresentaram um rendimento de 76% e de 52%, respectivamente, após purificação em sohxlet para remoção do excesso trifenilfosfina e do subproduto óxido de trifenilfosfina. O grau de substituição para o grupo amino para o derivado **4b** foi de 0,28. Os derivados carboxilados, foram sintetizado com os reagentes TEMPO/TCCA promovendo a oxidação seletiva das hidroxilas de C6 da unidade de β -D-Galp não substituídas por amino. Os resultados indicaram 100% de oxidação das hidroxilas nas frações **4a** e **4b** e os rendimentos foram de aproximadamente 50% para ambas as frações. Dessa forma, a rota de síntese utilizada se mostrou eficiente, sendo produzido, na maioria das reações, produtos na escala de gramas e as análises dos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) indicaram que a substituição do grupo tosila por azido e a redução deste a amino foi preferencial em C6 da unidade de β -D-Galp da agarose.

Palavras-chave: Polissacarídeos. Agarose. Modificação química. Derivados da Agarose.

ABSTRACT

Polysaccharides of red algae (agaranas and carrageenan) have attracted much attention due to its various applications and abundant marine stock. The objective of this work was the selective modification of C6 of β -D-Galp unit for the synthesis of amino carboxylate of agarose, through a synthesis of four steps. For this, was inserted tosyl, azide, amino and carboxyl groups in this position of the polysaccharide, generating agarose derivatives that show potential in the development of materials technology and pharmaceutical applications, such as in the biotechnology area, as support for the immobilization of enzymes, in chemical industry in organic synthesis and in the biomedical field in the production of biomaterials. Furthermore, was realized the chemical characterization of all synthesized products. The first reaction of the synthesis was the tosylation. This reaction was carried out in basic medium, therefore, it was first performed the reaction of agarose with NaBH_4 to reduction the polysaccharide reducing terminals. The preparative tosylation reactions, under optimized conditions, generated two tosyl derivative from agarose with a degree of substitution of tosyl group of 0.25 and 0.91 (fractions **2a** and **2b**), respectively, and 97% yields for both derivatives. The derivative **2b** show preference for the C6 position of the β -D-Galp unit, having a degree of substitution of 0.57 for this position. The azido derivatives of agarose were synthesized in preparative scale in optimal conditions, with a yield of 84% and 52% (fractions **3a** and **3b**). For the sample **3b** the degree of substitution by azido group was 0.50 for the C6 position of the β -D-Galp unit. The amino derivatives were synthesized via the Staudinger reaction using triphenylphosphine and water. The amino derivative **4a** and **4b** show a yield of 76% and 52%, respectively, after purification in sohxlet to remove the excess of triphenylphosphine and triphenylphosphine oxyde byproduct. The degree of substitution for the amino group to the derivative **4b** was 0.28. The carboxylated derivatives were synthesized with reagents TEMPO / TCCA promoting the selective oxidation of the C6 hydroxyl of the β -D-Galp unit unsubstituted amino. The results showed 100% oxidation of the hydroxyl fractions **4a** and **4b** and the yields were approximately 50% for both fractions. Thus, the synthesis route used is efficient, agarose derivatives was produced in gram scale, in most of the reactions and the analysis by nuclear magnetic resonance (NMR) indicated that the substitution of the tosyl group by azide and reduction of this to amine was preferential in C6 of β -D-Galp unit of agarose.

Keywords: Polysaccharides. Agarose. Chemical modification. Derivatives of Agarose.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	ESTRUTURA QUÍMICA BÁSICA DE CARRAGENANAS E AGARANAS.....	21
FIGURA 2 -	UNIDADES BÁSICAS REPETITIVAS DE AGAROSE, A: (1-3)- β -D-GALACTOPIRANOSE E B: (1-4)-3,6-ANIDRO- α -L-GALACTOPIRANOSE.....	22
FIGURA 3 -	AMINOAGAROSE: (a) REPRESENTAÇÃO QUÍMICA E (b) PRODUTO COMERCIAL SIGMA CNBr ACTIVATED SEPHAROSE®.....	27
FIGURA 4 -	PREPARO DO GEL DE AMINOAGAROSE.....	28
FIGURA 5 -	LIGAÇÃO COVALENTE DO LIGANTE À AGAROSE.....	30
FIGURA 6 -	MECANISMO PROPOSTO PARA FORMAÇÃO DE AGAROSE-CITOSINA.....	31
FIGURA 7 -	FORMAÇÃO DE 6-AMINOAGAROSE E FORMAÇÃO DE AMIDA.....	32
FIGURA 8-	PROCEDIMENTO DE PREPARO DO HIDROGEL DE AGAROSE:QUITOSANA.....	34
FIGURA 9 -	REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DA AGAROSE E LIGAÇÃO À DOPAMINA.....	36
FIGURA 10-	ESQUEMA GERAL DAS REAÇÕES REALIZADAS NO TRABALHO.....	38

FIGURA 11-	MODIFICAÇÕES QUÍMICAS NA AGAROSE PARA OBTENÇÃO DE SEUS DERIVADOS.....	49
FIGURA 12-	ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA AGAROSE REDUZIDA.....	51
FIGURA 13-	ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA AGAROSE REDUZIDA.....	52
FIGURA 14-	ESPECTRO DE RMN DE HSQC EDITADO DA AGAROSE REDUZIDA.....	52
FIGURA 15-	ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA AMOSTRA AGTS1.....	53
FIGURA 16-	ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA AMOSTRA AGTS2.....	54
FIGURA 17-	ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA AMOSTRA AGTS13.....	56
FIGURA 18-	ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-Vis DA AGAROSE NATIVA (a) E DAS AMOSTRAS TOSILADAS AGTS13 (b) e P9 (c) DISSOLVIDAS EM DMSO.....	57
FIGURA 19-	ESPECTROS DE RMN DE ^1H DOS PRODUTOS 2a (A) e 2b (B).....	60
FIGURA 20-	ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DAS AMOSTRAS AGAROSE REDUZIDA (a) E AGTS18 (b).....	61
FIGURA 21-	ESPECTRO DE RMN DE HSQC EDITADO DA AMOSTRA AGTS18.....	63
FIGURA 22-	ESPECTRO DE RMN DE HMBC DA AMOSTRA AGTS18.....	64

FIGURA 23-	REAÇÃO COLORIMÉTRICA PARA DETERMINAÇÃO DO GRUPO AZIDO.....	68
FIGURA 24-	COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ¹ H DAS AMOSTRAS AGAROSE 2a (a), AGN33 (b), AGN34 (c) E AGN35 (d).....	69
FIGURA 25-	REAÇÃO COLORIMÉTRICA PARA DETERMINAÇÃO DO GRUPO AZIDO NAS AMOSTRAS AGAROSE REDUZIDA (a), 3a (b) E 3b (c).....	69
FIGURA 26-	ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DAS AMOSTRAS 2a (a) e 3a (b).....	70
FIGURA 27-	ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA AMOSTRA 3b	71
FIGURA 28-	COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ¹ H DO DERIVADO TOSIL 2a (1) E DERIVADO AZIDO 3a (2).....	72
FIGURA 29-	COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ¹ H DO DERIVADO TOSIL 2b (1) E DERIVADO AZIDO 3b (2).....	72
FIGURA 30-	ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA AMOSTRA 3b	74
FIGURA 31 -	ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA AMOSTRA 3a	74
FIGURA 32-	MECANISMO DA REAÇÃO DE STAUDINGER PARA FORMAÇÃO DO DERIVADO AMINO DA AGAROSE.....	76
FIGURA 33-	ACOMPANHAMENTO DA REAÇÃO DE REDUÇÃO PELA COLORIMETRIA DA NINHIDRINA.....	77

FIGURA 34-	TESTE DA NINHIDRINA PARA A AMOSTRA AGNH1.....	78
FIGURA 35-	TESTE DA NINHIDRINA PARA A AMOSTRA 3b	78
FIGURA 36-	TESTE DA NINHIDRINA PARA OS PRODUTOS 4a e 4b APÓS PURIFICAÇÃO.....	79
FIGURA 37-	ESPECTROS DE RMN DE ¹ H DO DERIVADO AMINO- 4a ANTES (A) E APÓS PURIFICAÇÃO EM SOHXLET (B).....	80
FIGURA 38-	ESPECTROS DE RMN DE ¹ H DO DERIVADO AMINO- 4b ANTES (A) E APÓS PURIFICAÇÃO EM SOHXLET (B).....	80
FIGURA 39-	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DA AMOSTRA 4b	81
FIGURA 40-	ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA AMOSTRA 4b	84
FIGURA 41-	MECANISMO DE REAÇÃO UTILIZANDO OS REAGENTES TEMPO E TCCA.....	86
FIGURA 42-	ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DAS AMOSTRAS AGAROSE REDUZIDA (a) e AMOSTRA 5a (b).....	88
FIGURA 43-	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DA AMOSTRA 5a HIDROLISADA.....	89
FIGURA 44-	ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA AMOSTRA 5a	90
FIGURA 45-	ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA AMOSTRA 5b	90

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	REAÇÕES DE TOSILAÇÃO DA AGAROSE EM DIFERENTES SOLVENTES.....	54
TABELA 2 -	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE REAÇÃO DE TOSILAÇÃO DA AGAROSE.....	58
TABELA 3 -	ASSINALAMENTOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C DAS DIADES DE AGAROSE NATIVA E C6 TOSILADA.....	66
TABELA 4	OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DO DERIVADO AZIDO DA AGAROSE.....	67
TABELA 5 -	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^1H E ^{13}C DAS DIADE DE AGAROSE NATIVA E DO DERIVADO C6 AZIDO.....	75
TABELA 6-	CONDIÇÕES DE SÍNTESE DO DERIVADO AMINO DA AGAROSE.....	76
TABELA 7 -	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^1H E ^{13}C DAS DÍADES DE AGAROSE NATIVA E DO DERIVADO C6 AMINO.....	84
TABELA 8 -	OTIMIZAÇÃO DA OXIDAÇÃO SELETIVA DO DERIVADO AMINO DA AGAROSE.....	87
TABELA 9 -	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^1H E ^{13}C DAS DIADES DE AGAROSE NATIVA E DERIVADO C6 CARBOXILADO.....	91

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CCD - cromatografia em camada delgada

CD₃COOD – ácido acético deuterado

CuAAC - cicloadição azida-alqueno catalisada por cobre

CNBr - brometo de cianogênio

(CD₃)₂SO – dimetil sulfóxido deuterado

D₂O - óxido de deutério (água deuterada)

DIAD - azodicarboxilato de isopropila

DMF - dimetil formamida

DMSO - dimetil sulfóxido

DS - grau de substituição

EDC - 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

EDA – etilenodiamina

eq. – número de equivalentes

H₂SO₄ - ácido sulfúrico

HMBC - *heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy*

HSQC - *heteronuclear single quantum correlation spectroscopy*

HCl – ácido clorídrico

IgG - imunoglobulina G humana

KPS – *potassium persulfate*

RMN - ressonância magnética nuclear

RMN ¹H - ressonância magnética nuclear de hidrogênio um

RMN ^{13}C - ressonância magnética nuclear de carbono treze

RMN 1D - ressonância magnética nuclear unidimensional

RMN 2D – ressonância magnética nuclear bidimensional

ppm - partes por milhão

NaBH_4 - boroidreto de sódio

NaBr - brometo de sódio

NaClO – hipoclorito de sódio

nd - não detectado

NHS - *N*-hidroxisuccinamida

NaN_3 - azida de sódio

NaOH - hidróxido de sódio

NaIO_4 – periodato de sódio

N_2 – gás nitrogênio

PPh_3 - trifenilfosfina

PEI - polietilenimina

PBS - tampão fosfato salino

rpm – rotações por minuto

SO_2 – dióxido de enxofre

TCCA - ácido tricloroisocianúrico

Ts - grupo toсила

TsCl – cloreto de para-toluenossulfonila

TEMPO - *N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina

TREN – Tris- 2-aminoetil- amina

TFA - ácido trifluoracético

THF – tetrahidrofurano

UV - Ultravioleta

β -D-Galp – unidade de β -D-galactopiranoose

δ - deslocamento químico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 ALGAS VERMELHAS.....	20
2.1.1 Galactanas de algas vermelhas.....	21
2.1.1.1 Ágar e agarose.....	22
2.2 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS.....	23
2.2.1 Modificações químicas na agarose.....	25
2.2.1.1 Suporte para imobilização de enzimas.....	26
2.2.1.2 Matriz cromatográfica.....	29
2.2.1.3 Ligação a compostos fluorescentes.....	30
2.2.2 APLICAÇÕES BIOLÓGICAS DA AGAROSE.....	32
2.2.2.1 Síntese de biomaterias – Hidrogéis.....	33
2.2.2.2 Inserção de Grupos Funcionais: Atividade Biológica.....	35
3 JUSTIFICATIVA.....	37
4 OBJETIVOS.....	38
4.1 OBJETIVO GERAL.....	38
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
5.1 OBTENÇÃO DO POLISSACARÍDEO.....	40
5.2 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS NA AGAROSE 1.....	40
5.2.1 Síntese do derivado tosil da agarose 2a	40
5.2.2 Síntese do derivado tosil da agarose 2b	41
5.2.3 Síntese do derivado azido da agarose 3a	41
5.2.4 Síntese do derivado azido da agarose 3b	41
5.2.5 Síntese do derivado amino da agarose 4a	42
5.2.6 Síntese do derivado amino da agarose 4b	42
5.2.7 Síntese do derivado amino carboxilado 5a	43
5.2.8 Síntese do derivado amino carboxilado 5b	43
5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE SÍNTESE.....	44
5.3.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	44

5.3.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e refletância total atenuada (ATR/FTIR).....	44
5.3.3 Espectroscopia de Ultravioleta.....	45
5.4 OUTROS MÉTODOS ANALÍTICOS.....	45
5.4.1 Método colorimétrico para identificação de grupo azido.....	45
5.4.2 Método colorimétrico para identificação de grupo amino (Teste da Ninhidrina).....	45
5.4.3 Método colorimétrico para determinação de açúcar total.....	46
5.4.4 Dosagem de ácido urônico.....	46
5.4.5 Hidrólise dos derivados da agarose.....	47
5.4.6 Cromatografia em camada delgada.....	47
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
6.1 SÍNTESE DO DERIVADO TOSIL DA AGAROSE.....	50
6.1.1 Caracterização química do derivado tosil da agarose.....	61
6.2 SÍNTESE DO DERIVADO AZIDO DA AGAROSE.....	66
6.2.1 Caracterização química dos derivados azido da agarose 3a e 3b	70
6.3 SÍNTESE DO DERIVADO AMINO DA AGAROSE.....	75
6.3.1 Caracterização química dos derivados amino da agarose 4a e 4b	81
6.4 SÍNTESE DO DERIVADO AMINO CARBOXILADO DA AGAROSE.....	85
6.4.1 Caracterização química dos derivados amino carboxilado da agarose 5a e 5b	88
7 CONCLUSÃO.....	92
REFERÊNCIAS.....	94

1 INTRODUÇÃO

Recentemente há uma crescente procura por novos materiais a partir de fontes renováveis e biodegradáveis (ELCHINGER *et al.*, 2011). Nos últimos anos, organismos marinhos, tais como bactérias, microalgas e algas vêm representando uma grande fonte de materiais valiosos (CAMPO *et al.*, 2009).

Polímeros obtidos de algas são importantes fontes de biomateriais, uma vez que sua quiralidade inerente e superestruturas helicoidais contribuem para suas potenciais aplicações (HASEGAWA *et al.*, 2006). Esses biomateriais se apresentam, ainda, como soluções promissoras em termos ambientais, além de apresentarem boa performance, podendo proporcionar várias vantagens, a saber: o seu caráter bio-renovável, a sua disponibilidade, seu baixo custo e suas interessantes propriedades mecânicas (ELCHINGER *et al.*, 2011). Neste contexto o uso de polissacarídeos se mostra como uma alternativa viável e interessante para síntese de novos materiais.

Os polissacarídeos de algas marinhas têm atraído muita atenção devido à suas atividades biológicas e abundante estoque marinho. Dentre eles destacam-se a agarose e as carragenanas, polissacarídeos comerciais obtidos a partir de algas vermelhas (Rhodophyta) (JIAO *et al.*, 2011).

O ágar e sua sub-fração agarose são um dos polímeros mais comumente utilizados obtidos das algas vermelhas marinhas dos gêneros comercialmente importantes *Gelidium* e *Gracilaria*. A agarose é um polissacarídeo industrial de alto valor, sendo amplamente utilizada em aplicações biotecnológicas e na indústria de cosmético, química e alimentícia (RENN, 1984; MEENA *et al.*, 2007). Sua estrutura, química é formada por unidades alternadas de (1→3)-β-D-galactopiranosose e (1→4)-3,6-anidro-α-L-galactopiranosose (ELCHINGER *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2012).

A agarose tem recebido bastante atenção devido a sua inércia biológica, o que permite sua aplicação em algumas áreas. No entanto, para sua aplicação dentro da área biomédica, faz-se necessária a inserção de grupos funcionais para obtenção de derivados da agarose com atividade biológica, e assim, expandir suas aplicações (JIE *et al.*, 2012).

Além da área biomédica, a síntese de derivados da agarose pode ampliar suas aplicações em novos campos. Apesar da utilização já consolidada deste

polissacarídeo nas áreas de biotecnologia, a modificação deste polímero pode promover melhorias e expandir suas aplicações como suporte para imobilização de enzimas e matriz cromatográfica, por exemplo (BRESOLIN *et al.*, 2009; VIEIRA *et al.*, 2011). Dentro deste contexto, a modificação química de polímeros naturais, tais como a agarose, é um método promissor para a preparação de novos materiais (CHHATBAR *et al.*, 2012).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ALGAS VERMELHAS

As algas vêm sendo utilizadas como alimento no Japão e na China há milhares de anos. Há referências históricas do uso de algas na China do ano de 2000 aC, sendo estas, possivelmente, os organismos mais antigos na história evolutiva do planeta (PAINTER, 1983).

As algas são um grupo diverso de organismos que possuem importantes funções no ambiente aquático. Esse grupo é composto por organismos fotoautotróficos e com estruturas reprodutivas unicelulares (STEVENSON; BOTHWELL; LOWE, 1996). Através de vários esquemas taxonômicos as algas são divididas em mais de 24 classes, e em aproximadamente 26.000 espécies (BOLD; WYNNE, 1985).

As três principais divisões de macroalgas marinhas são a Phaeophyta (algas marrons), Chlorophyta (algas verdes) e Rhodophyta (algas vermelhas) (RORRER; CHENEY, 2004). As algas vermelhas compõem 5000-6000 espécies, classificadas na divisão Rhodophyta, estando distribuídas principalmente no ambiente marinho, alcançando maior diversidade em regiões tropicais (GRAHAM; WILCOX, 2000; RAVEN *et al.*, 2001).

As paredes celulares das algas vermelhas são constituídas de um componente rígido feito de microfibrilas no seu interior, enquanto exteriormente são formadas por um componente amorfo constituído de mucilagem (BOLD; WYNNE, 1985). Esta matriz mucilaginosa amorfa é composta predominantemente por vários tipos de galactanas sulfatadas (GRAHAM; WILCOX, 2000). Quantitativamente, a maior parte dos polissacarídeos extraídos de Rhodofíceas são galactanas constituídas inteiramente de unidades de galactose (PERCIVAL, 2007).

2.1.1 Galactanas de algas vermelhas

Em algas vermelhas, os polissacarídeos extraídos do componente amorfo da parede celular são formados por unidades de galactose, que apresentam uma estrutura linear composta por unidades básicas de β -D-galactopiranosose ligadas glicosidicamente através dos carbonos 1 e 3 (unidade A) e α -galactopiranosose ligadas através dos carbonos 1 e 4 (unidade B), formando assim unidades dissacarídicas repetitivas do tipo (AB)_n (PAINTER, 1983).

A unidade A é sempre constituída por um estereoisômero da série D, enquanto a unidade B (frequentemente na forma ciclizada, formando um anel 3,6-anidro) se apresenta na configuração D ou L (USOV, 1992). Assim, de acordo com a estereoquímica das unidades 4-O-ligadas, estas galactanas podem ser classificadas em agaranas (as que possuem configuração L-) e carragenanas (as que possuem configuração D-) (PAINTER, 1983), conforme representado na figura 1. Além destas duas classes, algumas ordens do filo Rhodophyta possuem algas que biossintetizam galactanas com estruturas híbridas às agaranas e carragenanas. Estas galactanas são denominadas de DL-híbridas. Neste tipo de estrutura, uma mesma molécula pode apresentar a unidade B tanto na configuração D- quanto na L- (STORTZ; CEREZO, 2000).

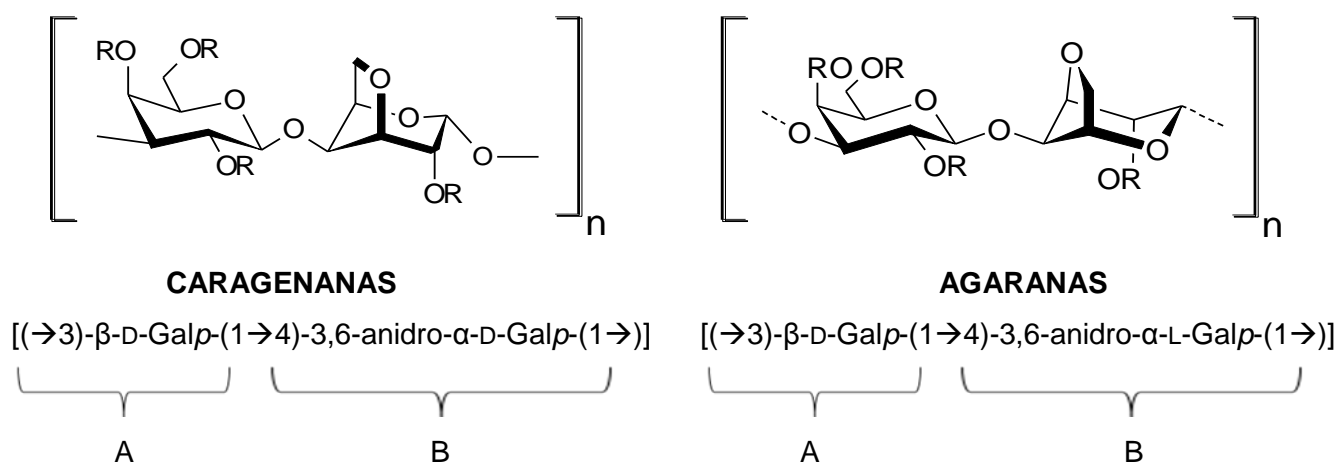


FIGURA 1- ESTRUTURA QUÍMICA BÁSICA DE CARRAGENANAS E AGARANAS.

R = H ou SO₃

FONTE: O autor (2015)

2.1.1.1 Ágar e agarose

Registros históricos apontam que o ágar é o ficocolóide de utilização mais antigo. Este polissacarídeo foi descoberto em 1658 e atualmente é vendido para fábricas na forma de extratos quentes ou na forma de gel (frio), sendo considerado o ficocolóide mais valioso. Segundo dados de 2001, o mercado de ágar alcançou 7.630 toneladas extraídas de 55.650 toneladas de algas secas gerando um capital de 132 milhões de dólares (FACCINI, 2007).

O ágar é uma mistura de polissacarídeos encontrado nas algas vermelhas, especialmente em membros da família Gelidiaceae e Gracilariaceae, sendo o gênero *Gracilaria* a maior fonte deste polissacarídeo (ARMISEN; GALACTAS, 1987; PELÉGRIN; MURANO, 2005). O ágar consiste de dois diferentes componentes: agarpectina e agarose, embora esta classificação seja um tanto simplista. A agarpectina é um polissacarídeo ácido que pode conter os substituintes éster de sulfato, metila e ácido pirúvico. A agarose é proveniente de frações menos iônicas do ágar, sendo um polissacarídeo neutro com uma estrutura linear repetitiva, constituída de β -D-galactopiranoose e 3,6-anidro- α -L-galactopiranoose (FIGURA 2) (ARAKI, 1966; RENN, 1984; FACCINI, 2007).

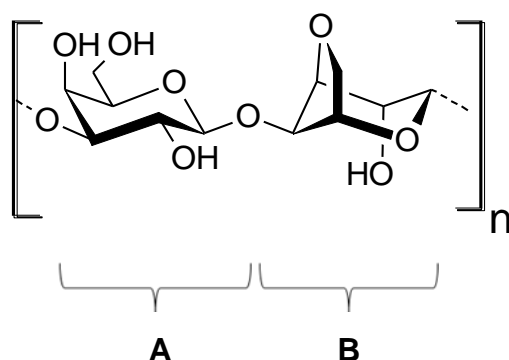


FIGURA 2- UNIDADES BÁSICAS REPETITIVAS DE AGAROSE, **A**: (1 \rightarrow 3)- β -D-GALACTOPIRANOSE E **B**: (1 \rightarrow 4)-3,6-ANIDRO- α -L-GALACTOPIRANOSE

FONTE: O autor (2015)

A agarose é um material industrialmente importante, de alto valor comercial (RENN, 1984; MEENA *et al.*, 2007). As espécies de algas dos gêneros *Gelidium* e *Gracilaria*, das quais este polissacarídeo é extraído tem apresentado um papel muito importante no campo da biotecnologia desde que Koch demonstrou que o ágar é um meio sólido adequado para crescimento de microrganismos (WANG *et al.*, 2012). Estima-se que aproximadamente 50 milhões de dólares de agarose são comercializados por ano, chegando alguns produtos a custar 25 mil dólares o quilograma (FACCINI, 2007). O uso deste polissacarídeo é extenso, encontrando aplicações em diferentes áreas tais como na área biomédica, sendo utilizado em liberação controlada de fármacos (*drug delivery*) (MEHROTA *et al.*, 2012), em terapia celular (VINEREAN *et al.*, 2011), biologia molecular (NOVAK *et al.*, 2011), em engenharia de tecidos biológicos (KHANARIAN *et al.*, 2012) e na indústria alimentícia, como agente de viscosidade e textura (WANG *et al.*, 2012). Esta gama enorme de aplicações se deve, principalmente, à suas interessantes propriedades mecânicas, biocompatibilidade e natureza inerte (SU *et al.*, 2013).

2.2 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS

Recentemente há uma crescente procura por novos materiais a partir de fontes renováveis e biodegradáveis, isso se deve ao fato destes biomateriais se apresentarem como soluções promissoras em termos ambientais além de apresentarem bom desempenho (ELCHINGER *et al.*, 2011). Polímeros obtidos de fontes naturais são gradativamente mais valorizados por representarem uma nova categoria de materiais ambientalmente seguros para se explorar as aplicações (SIMKOVIC, 2008). Estes biopolímeros apresentam diversas propriedades por si só, no entanto, modificações e funcionalizações destas moléculas são frequentemente necessárias objetivando alcançar estruturas moleculares de interesse (ELCHINGER *et al.*, 2011).

Por exemplo, carboidratos funcionalizados com grupos químicos, tais como: SH, NH₂ e COOH, podem ser usados como ferramentas sintéticas para purificação e caracterização de proteínas (RATNER *et al.*, 2004).

Outro exemplo é a funcionalização do polissacarídeo com um grupo azido (N_3), que pode ser obtido através de uma reação de substituição nucleofílica de segunda ordem de um derivado tosilado, sendo este grupo tosil um excelente grupamento de saída nessas reações (GERICKE *et al.*, 2012).

Derivados azidos são importantes em síntese orgânica, uma vez que podem ser transformados em um grupamento amino (ROSTOVTSEV *et al.*, 2002). A síntese de aminopolissacarídeos é de particular interesse, uma vez que estes produtos gerados têm grande importância biológica e química. Pesquisas têm demonstrado que polissacarídeos contendo grupos amino funcionais apresentam um grande número de aplicações na área farmacêutica e biomédica (FOX; EDGAR, 2012).

Além disso, o intermediário azido apresenta estabilidade extraordinária frente a H_2O , O_2 e a maior parte das condições em síntese orgânica (ROSTOVTSEV *et al.*, 2002). Uma vez gerado o derivado azido do polissacarídeo, este pode ser utilizado como grupamento reativo para *click chemistry*. A *click chemistry* consiste na reação entre dois grupamentos químicos, como por exemplo, em reações de substituições nucleofílicas, cicloadição e adições de ligações duplas carbono-carbono. No entanto a cicloadição azida-alqueno catalisada por cobre (CuAAC) é geralmente considerado como o exemplo por excelência da *click chemistry* (LUTZ; ZARAFSHANI, 2008). A CuAAC é uma reação extremamente quimiosseletiva e pode ser utilizada para modificar biomoléculas funcionais, tais como polissacarídeos. Relatos recentes têm confirmado que a CuAAC é uma ferramenta muito útil em aplicações biológicas (LUTZ; ZARAFSHANI, 2008). As vantagens da *click chemistry* são que estas reações por definição tratam-se de reações de grande alcance, que dão rendimentos elevados, geram subprodutos inofensivos e que podem ser removidos por métodos não cromatográficos (KOLB; FINN; SHARPLESS, 2001). As características do processo exigidas incluem condições simples de reação, materiais e reagentes de partida facilmente disponíveis, a não utilização de solvente ou a utilização de um solvente menos agressivo (tal como água) ou facilmente removível, e o simples isolamento do produto (KOLB; FINN; SHARPLESS, 2001).

Os polissacarídeos obtidos a partir da *click chemistry* podem ter inúmeras aplicações, tais como dendrímeros (ELCHINGER *et al.*, 2011), na formação de géis (LUTZ; ZARAFSHANI, 2008), em domínios terapêuticos, sendo usados para distribuição de drogas (ELCHINGER *et al.*, 2011) e na descoberta de novas drogas,

sendo provavelmente a área da biociência em que o conceito *Click* é mais amplamente aplicado (LUTZ; ZARAFSHANI, 2008).

Dentro deste contexto, a modificação química destes polímeros naturais é um método promissor para a preparação de novos materiais com aplicações potenciais. Existem numerosos relatos na literatura da modificação de polissacarídeos, aplicando estratégias diversas (CHHATBAR *et al.*, 2012). Assim, o interesse que esses polissacarídeos têm recebido de químicos vem crescendo nos últimos anos (ELCHINGER *et al.*, 2011).

2.2.1 Modificações químicas na agarose

A agarose é um polissacarídeo que forma um gel termoreversível quando uma solução a quente deste polímero é resfriada a temperaturas abaixo de 40 °C. Esta propriedade vem sendo extensivamente utilizada na área biomédica (SU *et al.*, 2013). Entretanto sua aplicação nesta área é limitada devido à sua inércia biológica, sendo necessária a inserção de grupos funcionais para obtenção de derivados da agarose com atividade biológica, para assim, expandir suas aplicações (JIE *et al.*, 2012).

Além disso, apesar da utilização já consolidada deste polissacarídeo nas áreas biotecnológica e de biologia molecular, a modificação deste polímero pode expandir ou melhorar sua aplicabilidade. Por exemplo, em sistemas de imobilização de enzimas o suporte deve apresentar algumas características, tais como oferecer uma grande superfície interna e uma alta densidade de grupos reativos (VIEIRA *et al.*, 2011), o que pode ser alcançado modificando as características químicas através da funcionalização com novos grupamentos.

Produtos derivados da agarose vêm sendo utilizados para diferentes aplicações. Uma delas é sua aplicação como matriz cromatográfica, para separação de macromoléculas como proteínas (JOST *et al.*, 1974; VOET, 2013). A agarose, ainda vêm sendo ligada a compostos fluorescentes, objetivando por exemplo a aplicação destes produtos como sensores na indústria farmacêutica (OZA *et al.*, 2012; KONDAVEETI *et al.*, 2013). Além disso, derivados da agarose podem ser utilizados em aplicações biológicas. Neste contexto, uma aplicação muito importante

é a síntese de biomaterias, tais como hidrogéis, que podem ser utilizados em diferentes áreas (MARTIN *et al.*, 2008; KONDAVEETI *et al.*, 2013; GÓMEZ-MASCARAQUE *et al.*, 2014).

Por fim, uma modificação também aplicada é a inserção de grupos funcionais que podem contribuir dando alguma atividade biológica a este polissacarídeo (PARK *et al.*, 2007; JIE *et al.*, 2012; SU *et al.*, 2012).

2.2.1.1 Suporte para imobilização de enzimas

Imobilização é um termo genérico empregado para descrever a retenção de uma biomolécula no interior de um reator ou de um sistema analítico (CARDOSO, 2009). O uso de sistemas de imobilização de enzimas no processo industrial, em comparação com o uso de enzimas solúveis, traz várias vantagens como a redução dos custos do processo uma vez que se reduz a quantidade de enzima necessária e o derivado imobilizado pode ser recuperado ao fim do processo. Além disso aumenta a estabilidade da enzima protegendo-a contra diferentes agentes de inativação (VIEIRA *et al.*, 2011; TAVANO *et al.*, 2013). O uso de um suporte apropriado e condições adequadas de imobilização podem favorecer a estabilização e a boa atividade da enzima, simplificando seu uso em diferentes aplicações industriais (TAVANO *et al.*, 2013).

Suportes diferentes podem ser utilizados para imobilização de uma enzima através de fenômenos químicos ou físicos diferentes (HERNANDEZ; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011). Existem dois tipos de imobilização, um deles é a imobilização reversível e a outra é a imobilização covalente. A primeira delas pode proporcionar uma forma de reutilizar a enzima por vários ciclos e recuperar o suporte, utilizando-o novamente após inativação. Um exemplo disto é a interação iônica de uma enzima estável em um suporte aniônico, tal como suportes aminados (TAVANO *et al.*, 2013). Entretanto a imobilização da enzima não garante sua estabilização estrutural, o que é o alvo da aplicação industrial da biocatálise (VIEIRA *et al.*, 2011). Assim, se no sistema é buscado a estabilização da enzima imobilizada, a imobilização covalente é a estratégia recomendada, uma vez que esta promove uma rigidificação interessante

das moléculas de proteínas, resultando em derivados altamente estabilizados (MATEO *et al.*, 2007; VIEIRA *et al.*, 2011).

A agarose é um polissacarídeo amplamente utilizado como suporte para imobilização de enzimas. Uma modificação já realizada neste polímero, para este fim é a ativação da matriz polimérica por brometo de cianogênio (CNBr), descrito por Axen *et al.* (1967), gerando um produto comercial, a aminoagarose (FIGURA 3). Neste caso a ligação entre o ligante e a matriz é realizada via grupos amino livres (JOST *et al.*, 1974).



FIGURA 3- AMINOAGAROSE: **(a)** REPRESENTAÇÃO QUÍMICA E **(b)** PRODUTO COMERCIAL SIGMA CNBr ACTIVATED SEPHAROSE®

Spagna *et al.* (2000), também modificaram a estrutura da agarose inserindo grupos amino, com o objetivo de aumentar a afinidade do suporte de agarose pela enzima β -glucosidase. O método de inserção dos grupos amino na matriz polimérica, descrito pelos autores, representado na figura 4, foi realizado em duas etapas: na primeira etapa (a) o gel de agarose foi transformado no derivado aldeído, através da reação com o glicidiol, seguido da oxidação da gliceril-agarose resultante com periodato. Na segunda etapa (b) o derivado aminado foi obtido através da funcionalização dos grupos aldeídos com etilenodiamina (EDA) e a subsequente redução com NaBH_4 .

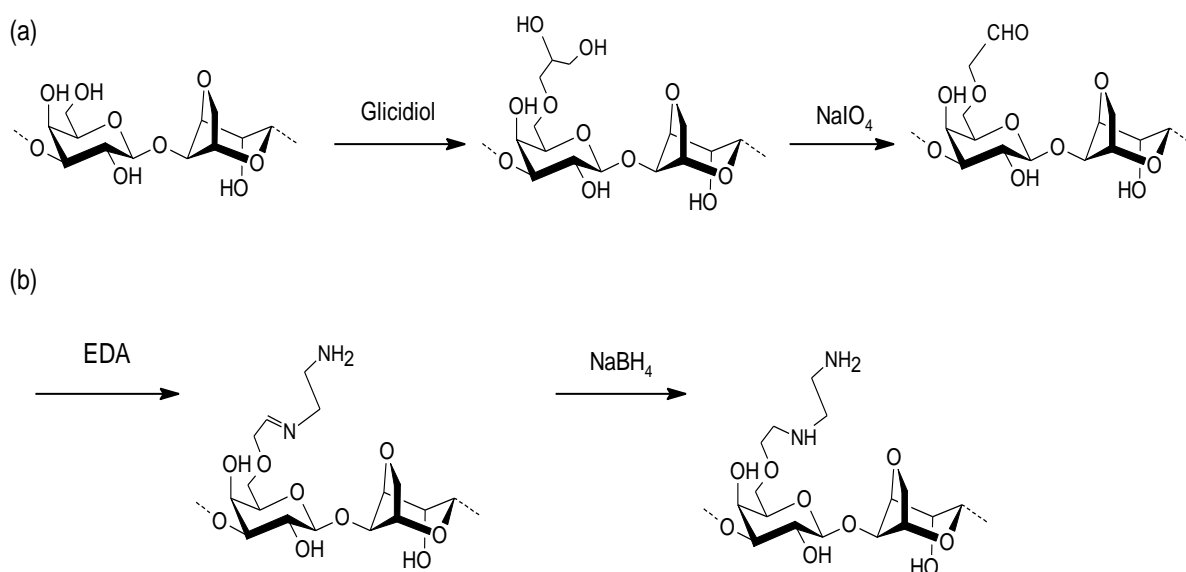


FIGURA 4- PREPARO DO GEL DE AMINOAGAROSE

FONTE: Adaptado de Spagna *et al.* (2000)

Com o mesmo objetivo de imobilização da β glucosidase, Vieira *et al.* (2011) fizeram diversas modificações na matriz polimérica da agarose visando otimizar a estabilidade/atividade da enzima imobilizada. A matriz foi derivatizada com diferentes grupos reativos, como por exemplo polietilenimina (PEI), glioxil (aldeídos alifáticos lineares) e epóxi-amina. O suporte de epóxi-amina agarose foi o que apresentou melhores resultados, a atividade de recuperação foi de 68% e a enzima imobilizada se mostrou 200 vezes mais estável que a imobilizada em suporte de CNBr-agarose.

Dessa forma, sempre são buscadas novas matrizes que atendam às necessidades específicas de cada sistema. Assim, a busca por novos suportes através da modificação química das matrizes poliméricas para imobilização de enzimas é um campo bastante promissor.

2.2.1.2 Matriz cromatográfica

Na técnica de cromatografia de afinidade uma molécula ligante é acoplada covalentemente a uma matriz porosa inerte. Quando se passa uma solução proteica impura através deste material cromatográfico, a proteína de interesse liga-se ao ligante imobilizado, enquanto as outras substâncias são lavadas da coluna pelo tampão. A proteína de interesse pode ser depois recuperada na forma pura, trocando-se as condições de eluição de maneira que a proteína seja liberada da matriz cromatográfica (VOET, 2013).

A cromatografia de afinidade já foi usada para isolar substâncias como enzimas, anticorpos, proteínas de transporte, receptores hormonais, membranas e até células inteiras. A matriz cromatográfica, na cromatografia de afinidade, deve ser quimicamente inerte, apresentar alta porosidade e possuir um grande número de grupos funcionais capazes de formar ligações covalentes com os ligantes. Dentre os poucos materiais disponíveis que cumprem estes critérios, a agarose, é sem dúvida a mais utilizada (VOET, 2013; JOST *et al.*, 1974).

Se o ligante possuir um grupo amina primário que não é essencial para sua ligação à proteína de interesse, o ligante pode ser ligado covalentemente à agarose via reação dos grupos amino com a agarose ativada por brometo de cianogênio (FIGURA 5). Ainda, a ligação da CNBr agarose à alquilaminas e arilaminas é capaz de aumentar a afinidade à proteínas negativamente carregadas, tais como ovalbumina e β -lactoglobulina (VOET, 2013; JOST *et al.*, 1974).

Dentro deste contexto, muitos grupos de pesquisa vêm estudando a modificação química destas resinas de agarose para resolver problemas específicos. Como por exemplo, Bresolin *et al.* (2008) ligaram o TREN (Tris(2-aminoetil)amina) à agarose para utilizá-la na purificação da imunoglobulina G humana (IgG). O ligante não biológico TREN, composto por 4 átomos de nitrogênio, apresenta uma alta densidade de grupos amino, podendo ser utilizado em cromatografia aniônica. O ligante TREN, foi imobilizado na agarose através de uma ligação éter (em gel ativado por epicloridrina) e este sistema foi capaz de purificar a IgG humana satisfatoriamente.

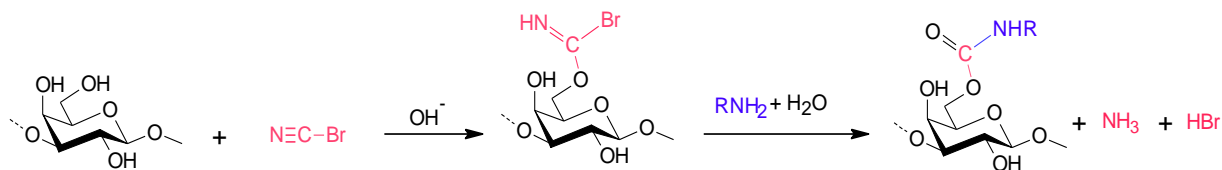


FIGURA 5- LIGAÇÃO COVALENTE DO LIGANTE À AGAROSE.

Primeiramente ocorre a ativação da agarose com CNBr, seguida de sua reação com uma amina primária para formar um ligante acoplado covalentemente.

FONTE: Adaptado de Voet (2013)

2.2.1.3 Ligação a compostos fluorescentes

O fenômeno da fluorescência vem sendo utilizado nos últimos tempos com diferentes finalidades. Polissacarídeos conjugados são preparados com fluoresceína para que sejam diferenciados de polissacarídeos não derivatizados. A fluorescência é também utilizada para localizar e quantificar proteínas da superfície celular em pesquisas de biologia celular (OZA *et al.*, 2010).

Devido à grande aplicação de sistemas fluorescentes, para diferentes finalidades, pesquisadores vêm investindo em modificações químicas na agarose, inserindo grupos fluorescentes. Assim, Oza *et al.* (2011) realizaram a inserção da base nitrogenada citosina no esqueleto da agarose e também da *kappa* carragenana sob irradiação de micro-ondas, usando persulfato de potássio como iniciador. O mecanismo de reação proposto pelos autores (FIGURA 6) foi via radical livre, em que o ânion sulfato radical é formado primeiramente a partir do persulfato de potássio sob irradiação de micro-ondas. Então o íon radical gera o radical livre da agarose no carbono 6 com eliminação do radical hidroxila (A) bem como o radical da citosina (B) no seu carbono 4. As duas espécies (A e B) foram então finalmente unidas para formar uma nova ligação C-N resultando no produto agarose-citosina.

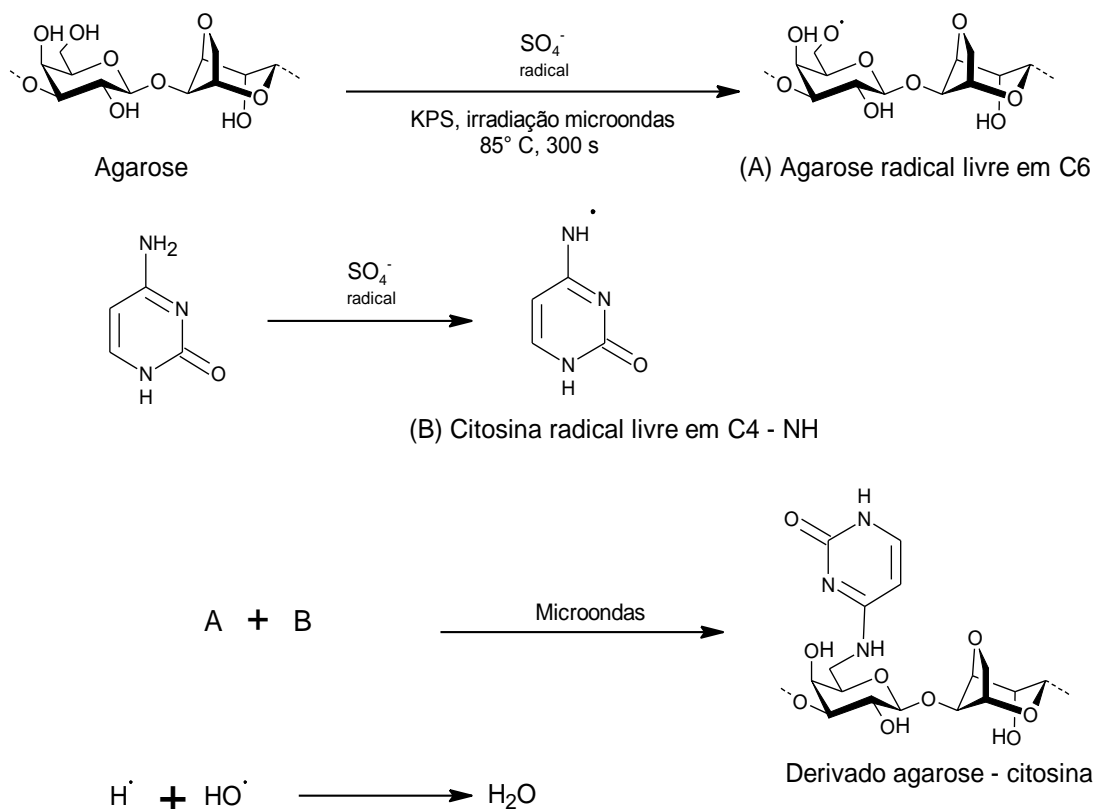


FIGURA 6- MECANISMO PROPOSTO PARA FORMAÇÃO DE AGAROSE-CITOSINA

FONTE: Adaptado de Oza; Meena; Siddhanta (2011)

Neste estudo, foi observado o aumento da fluorescência dos polissacarídeos em comparação com a citosina sozinha, tendo a agarose-citosina exibido fluorescências excepcionalmente mais altas que a carragenana-citosina (OZA *et al.*, 2011).

Em 2014, Kondaveeti *et al.* também realizaram a síntese de novos compostos fluorogênicos, desta vez através da 6-aminoagarose (FIGURA 7). Para isto foi necessária primeiramente a síntese da 6-aminoagarose, que ocorreu através da reação da agarose com a ftalimida, trifenilfosfina (PPh_3) e azodicarboxilato de isopropila (DIAD), sob irradiação de microondas a 100°C , formando a agarose-ftalimida. Esta em seguida sofreu hidrazinólise com hidrato de hidrazina em reator de microondas a 60°C , gerando a 6-aminoagarose. Uma vez obtido este produto, este reagiu com os ácidos picolínico e nicotínico a temperatura ambiente por 12 h, em meio contendo *N*-etilcarbodiimida (EDC) e *N*-hidroxisuccinamida (NHS), gerando os amido derivados da aminoagarose (FIGURA 7).

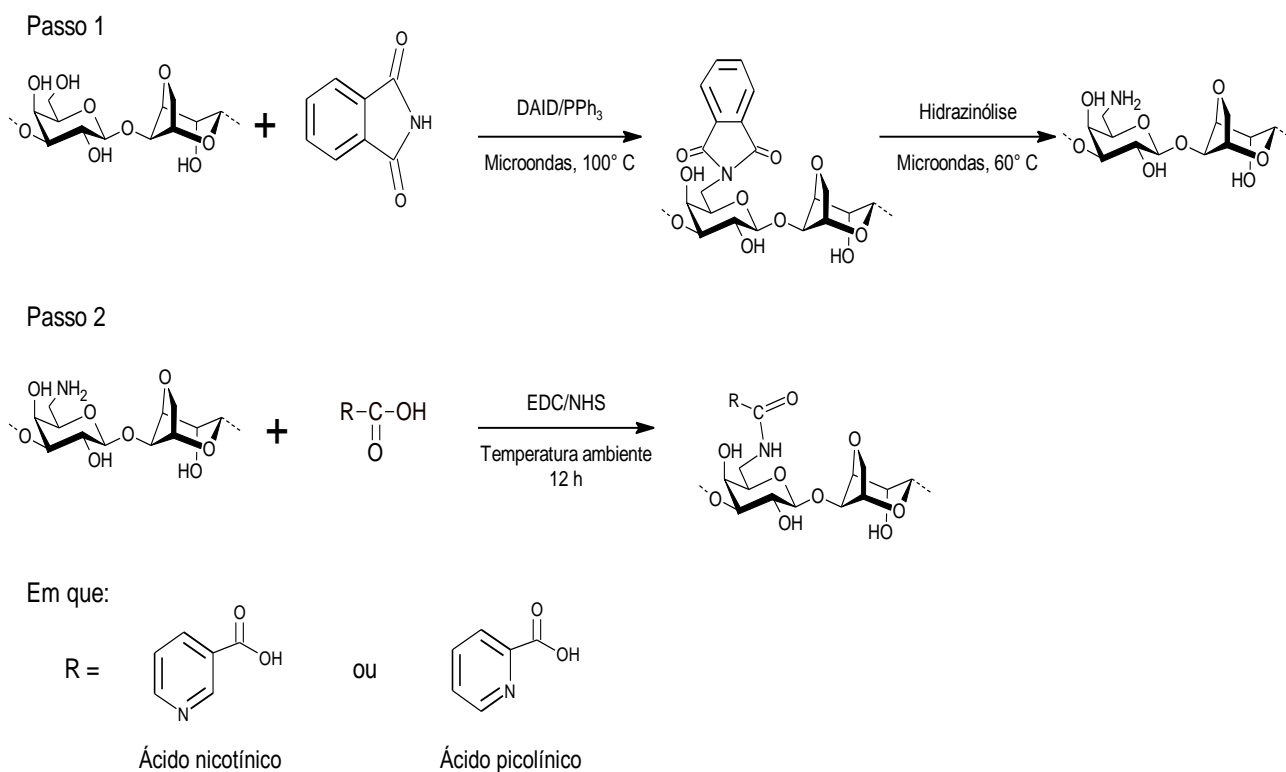


FIGURA 7- FORMAÇÃO DE 6-AMINOAGAROSE E FORMAÇÃO DE AMIDA

FONTE: Adaptado de Kondaveeti; Mehta; Siddhanta (2014)

Segundo Kondaveeti *et al.* (2014) o derivado aminado sintetizado pode ser aproveitado também na síntese de vários materiais alvo que envolvem os grupos amino e amido, tais como produtos utilizados em tecnologias de separação por afinidade. As amidas fluorogênicas de ácido carboxílico de piridina da agarose, sintetizadas ao fim, podem encontrar aplicações como sensores nas indústrias farmacêuticas e biomédicas.

2.2.2 APLICAÇÕES BIOLÓGICAS DA AGAROSE

Além das modificações realizadas a fim de aumentar suas aplicabilidades na área da indústria, a agarose também vem sendo estudada para aplicações na área biológica. Suas características físico-químicas propiciam a este polissacarídeo uma versatilidade de aplicações.

Uma das aplicações nesta área é a utilização deste polissacarídeo na síntese de biomateriais. Sua capacidade de formar géis é amplamente explorada na síntese de hidrogéis. Sua presença proporciona um ambiente úmido e aumenta a

estabilidade ao sistema quando em combinação com outros polissacarídeos (MASCARAQUE *et al.*, 2014).

Outras aplicações se dão através da inserção de grupos funcionais em sua estrutura. Como por exemplo a inserção de grupamento sulfato, o que pode gerar moléculas com potencial atividade antitrombogênica (JIE *et al.*, 2012), e a oxidação deste polímero, o que pode aumentar suas propriedades de superfície e ampliar suas aplicações dentro da área biológica (SU *et al.*, 2012, PARK *et al.*, 2007).

2.2.2.1 Síntese de biomaterias - Hidrogéis

Hidrogéis são polímeros hidrofílicos tridimensionais formados por muitas moléculas de peso molecular alto ou baixo em água. Eles são caracterizados pela presença de *crosslinks* físicos ou químicos, enovelamentos e/ou rearranjos dos domínios hidrofóbicos ou hidrofílicos (KONDAVEETI *et al.*, 2013; GÓMEZ-MASCARAQUE *et al.*, 2014).

Devido às propriedades derivadas de suas estruturas específicas, estes sistemas têm encontrado aplicações como biomateriais em biomedicina. Tanto polímeros sintéticos, quanto biopolímeros podem ser usados para síntese de hidrogéis (GÓMEZ-MASCARAQUE *et al.*, 2014).

Polímeros sintéticos são comumente utilizados para este fim, no entanto estes são hidrofóbicos e são processados sob condições relativamente severas. Dessa forma, os polissacarídeos vêm sendo muito utilizados, objetivando resolver estes problemas. Estes biopolímeros possuem caráter predominantemente hidrofílico e a presença de grupos hidroxilas na sua estrutura torna possível a formação de ligações de hidrogênio intra e intercadeias. Devido a sua estrutura química, eles frequentemente formam géis em solução (DRURY *et al.*, 2003; GÓMEZ-MASCARAQUE *et al.*, 2014).

Géis de agarose promovem um ambiente úmido e aumentam a estabilidade do sistema quando em combinação com outros polissacarídeos. Por estes motivos este polissacarídeo vem sendo utilizado para aplicações tais como em engenharia de tecidos biológicos, para utilização na cicatrização de feridas e regeneração de

tecidos moles, por exemplo (MARTIN *et al.*, 2008; GÓMEZ-MASCARAQUE *et al.*, 2014).

Tendo isto em vista, Gómez-Mascaraque *et al.* (2014), sintetizaram um hidrogel de agarose e quitosana, utilizando dextrinas oxidadas como *crosslinker*, objetivando criar um sistema para ser utilizado em engenharia de tecidos. Para síntese foi feita primeiramente a oxidação da dextrina com periodato de sódio. O gel de agarose foi preparado, aquecendo-se solução do polissacarídeo a 85 °C seguido de resfriamento a 40 °C e a solução de quitosana foi preparada a esta temperatura. À solução de dextrina oxidada foi adicionada a solução de agarose e em seguida este sistema foi misturado à solução de quitosana. A mistura foi vigorosamente agitada por 5 minutos, ultrasonificada, colocada em molde de teflon e transferida para um forno a 37 °C até evaporação do solvente (FIGURA 8).

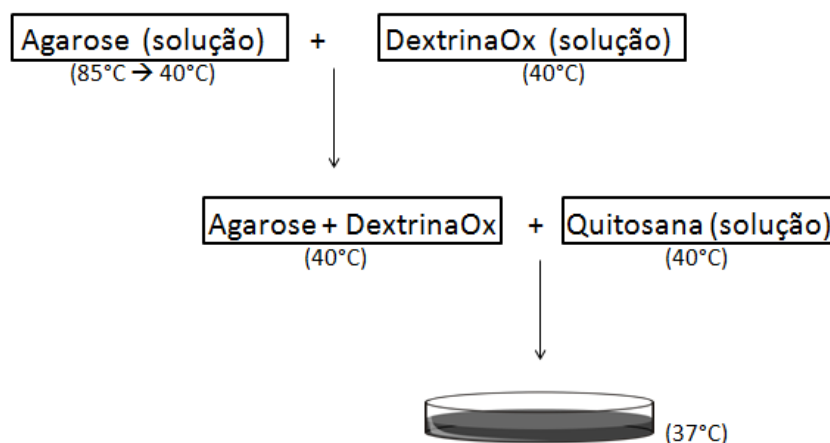


FIGURA 8- PROCEDIMENTO DE PREPARO DO HIDROGEL DE AGAROSE:QUITOSANA

FONTE: Adaptado de Mascaraque *et al.* (2014)

Neste trabalho, foram testadas várias razões de massa agarose:quitosana, encontrando-se a melhor razão como sendo 25:75 para o objetivo proposto do trabalho. Neste caso a molécula de agarose não se encontra ligada covalentemente, mas sua presença confere algumas propriedades físico-químicas interessantes, como propriedades térmicas, turgescência e viscoelasticidade, essenciais ao hidrogel.

2.2.2.2 Inserção de Grupos Funcionais: Atividade Biológica

Como um dos polissacarídeos de algas vermelhas, a agarose vem recebendo bastante atenção devido a sua biocompatibilidade. Modificações da sua estrutura com grupos funcionais são necessárias para obtenção de derivados da agarose com atividade biológica, para dessa forma, expandir suas aplicações (JIE *et al.*, 2012).

A sulfatação de polímeros é o método mais popular para sintetizar análogos da heparina, droga anticoagulante de referência. Assim, Jie *et al.* (2012), realizaram a sulfatação da agarose, objetivando dar uma atividade antitrombogênica a este polissacarídeo. A síntese da agarose sulfatada foi realizada com ácido clorosulfônico-piridina, tendo formaldeído como agente dispersante. Três fatores, incluindo a razão de ácido clorosulfônico e agarose (2:1, 3:1, 4:1 (mL/g)), tempo de reação (3 h, 4 h, 5 h) e temperatura (45 °C, 65 °C, 85 °C) afetaram o grau de substituição (DS) por grupo sulfato na agarose. No estudo foram caracterizadas duas frações, uma com DS=0,17 e outra com DS=0,43. Ambas apresentaram atividade antitrombogênica maior que a agarose nativa, ocorrendo melhora desta atividade com o aumento do DS das amostras.

A agarose, como a maioria dos hidrogéis, não é favorável a adesão e crescimento celular, devido à sua hidrofiliidade. Além disso a agarose não absorve proteínas de adesão celular, resultando em propriedades anti-adesivas. Assim, sua modificação é uma alternativa para promover adesão celular (SU *et al.*, 2013).

Assim, Su *et al.* (2013) oxidaram a hidroxila primária do carbono 6 da agarose e ligaram dopamina nesta agarose carboxilada. A oxidação foi realizada com o reagente de oxidação TEMPO (*N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina), sob condição alcalina. Essa forma de oxidação é um método efetivo de introduzir carboxila em polissacarídeos, mostrando alta seletividade de oxidação do carbono 6, que contém uma hidroxila primária. A reação foi realizada usando TEMPO, NaBr (brometo de sódio) e NaClO (hipoclorito de sódio) em condição alcalina (pH=10,5), mantida através da adição de solução de NaOH 1 M. A reação foi realizada a temperatura ambiente por 2 h. A máxima carboxilação alcançada foi de 30 % em C6, e com esta porcentagem foi realizada a ligação à dopamina. Para ligar a dopamina, a agarose carboxilada, em tampão fosfato salino (PBS), reagiu com 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e dopamina por 2 h, em pH 5,5, mantido por

solução de HCl 0,5 M. A taxa de ligação da dopamina foi calculada em 9,3%. O esquema geral da síntese está representado na figura 9, abaixo:

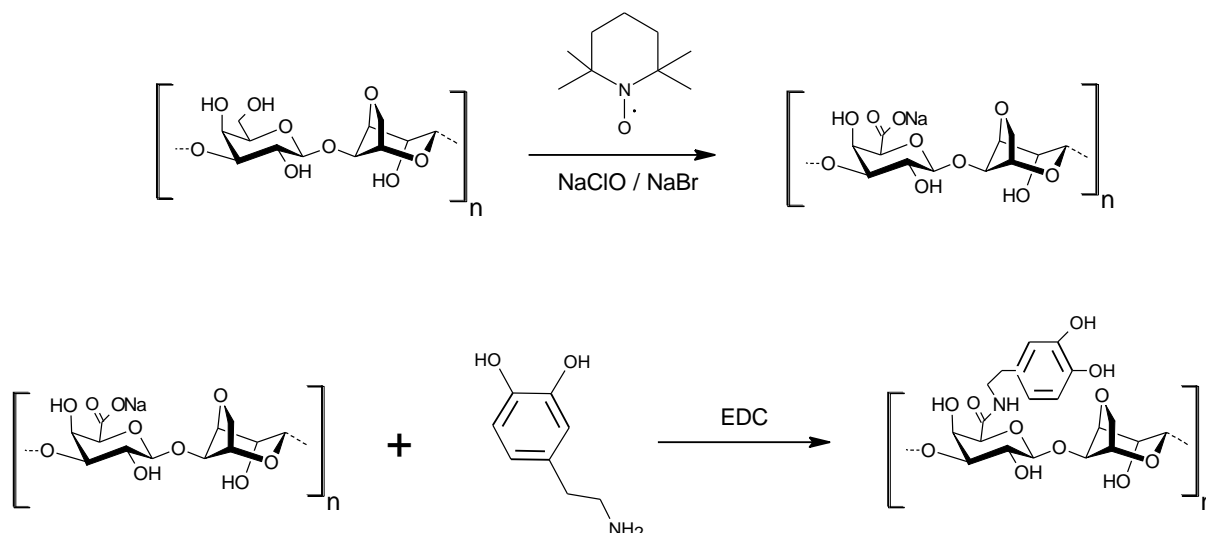


FIGURA 9- REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DA AGAROSE E LIGAÇÃO À DOPAMINA
 FONTE: Adaptado de Su *et al.* (2013)

Tanto a agarose somente carboxilada, quanto a ligada à dopamina neste estudo não mostraram citotoxicidade e aumentaram a adesão celular. Segundo os autores, o estudo sugeriu que a agarose modificada com grupos funcionais é uma ferramenta promissora para aumentar sua bioatividade. A modificação, inserindo uma carboxila, pode efetivamente aumentar as propriedades de superfície de materiais e ainda promover a absorção de proteínas por favorecer a ligação, proliferação e diferenciação celular. Grupos carboxila são grupos ativos que reagem facilmente com outros grupos, por adsorção eletrostática ou reação química.

Os estudos citados mostram a enorme gama de aplicações da agarose e seus derivados em diferentes áreas, demonstrando a importância da síntese e caracterização de novos derivados, com potenciais aplicações, deste polissacarídeo.

3 JUSTIFICATIVA

A agarose é um polissacarídeo neutro, biologicamente inerte, encontrado em abundância na natureza e de fácil obtenção, sendo assim um bom substrato para modificações químicas. A inserção de grupos funcionais na sua estrutura e, portanto, a obtenção de derivados da agarose, pode aumentar suas aplicações dentro da indústria - onde este já é muito utilizado como matriz cromatográfica e como suporte para imobilização de enzimas. Os derivados da agarose podem ter suas aplicações expandidas também para outras áreas, tais como em síntese orgânica, podendo ser utilizado como catalisadores em reações químicas e como substrato para novas reações com diferentes finalidades. Além disso, dentro da área biomédica, este polissacarídeo pode ser utilizado como biomaterial para produção de hidrogéis aplicados em engenharia de tecidos biológicos. A inserção de grupos funcionais pode, ainda, dar novas aplicabilidades a este polímero, como por exemplo, a inserção de grupo carboxila pode aumentar suas propriedades de superfície, promovendo a absorção de proteínas e a inserção de grupo amino que pode conferir propriedades hemostáticas, mucoadesivas e bacteriostáticas ao polissacarídeo. Dessa forma, este trabalho tem como foco a síntese e caracterização química de derivados da agarose que podem apresentar diversas aplicações relacionadas à síntese orgânica e também à atividades biológicas, ampliando suas aplicações na indústria e ainda permitindo novas aplicações em outras áreas.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é a modificação seletiva de C6 da unidade de β -D-Galp da agarose para síntese e caracterização de derivado amino carboxilado da agarose (FIGURA 10).

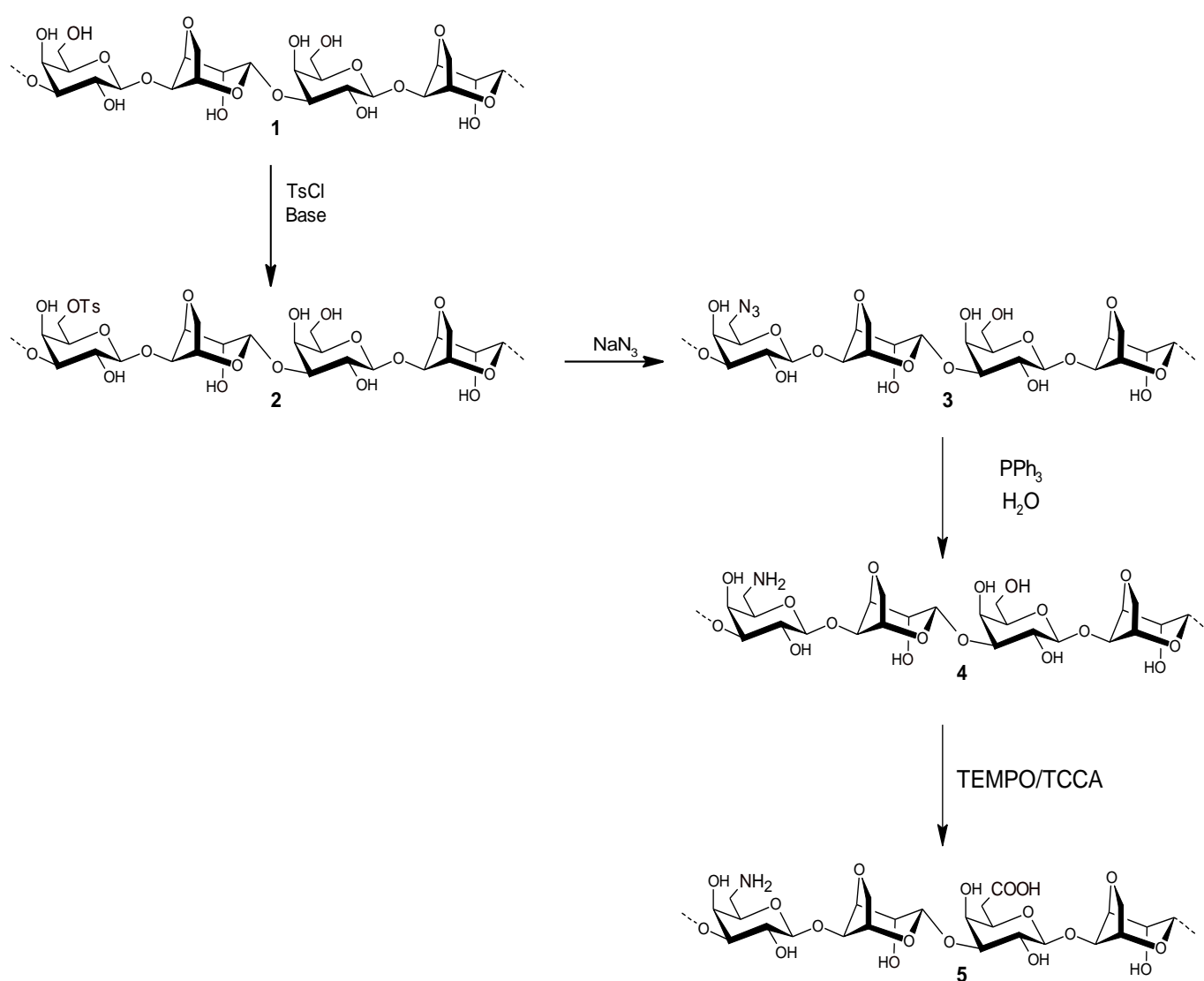


FIGURA 10- ESQUEMA GERAL DAS REAÇÕES REALIZADAS NO TRABALHO
 FONTE: O autor (2015)

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar o derivado tosil **2** da agarose, através da reação de tosilção da agarose reduzida **1**.
- Sintetizar o derivado azido **3** da agarose através da reação de substituição nucleofílica com azida de sódio, a partir do derivado tosil **2** da agarose.
- Sintetizar o derivado amino **4** da agarose através da redução de Staundiger , partindo-se do derivado azido **3** da agarose.
- Sintetizar o derivado amino carboxilado **5** da agarose através da oxidação seletiva com N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO) e ácido triclorohisocianúrico (TCCA), a partir do derivado amino **4** da agarose.
- Caracterizar todos os derivados sintetizados utilizando métodos químicos e espectroscópicos (Ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C , 1D e 2D, infravermelho e ultravioleta).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 OBTENÇÃO DO POLISSACARÍDEO

O polissacarídeo utilizado durante o trabalho é uma agarose comercial obtida da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A nomenclatura para as unidades estruturais poliméricas, neste trabalho, segue a convencionada por Knutsen *et al.* (1994), em que G refere-se a unidade de D-galactose e LA a unidade 3,6-anidro-L-galactose.

5.2 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS NA AGAROSE 1

5.2.1 Síntese do derivado tosil da agarose **2a**

Antes de iniciar a reação de tosilação, o polissacarídeo foi submetido a redução dos terminais redutores de acordo com o método adaptado de Araújo *et al.* (2013). Assim, 10 g de agarose foram dissolvidos em 500 mL de água destilada a 90 °C. Então, a solução foi resfriada e em banho de gelo foram adicionados 1,5 g de NaBH₄, com auxílio de bastão de vidro para agitação. A solução gelificada foi deixada *overnight* a temperatura ambiente. Após o fim da reação o pH foi reduzido de 10,0 para 4,5, com ácido acético glacial. A agarose reduzida foi então dispersa em água e submetida à diálise contra água destilada para eliminação do excesso de NaBH₄. Após diálise a solução foi concentrada e liofilizada, obtendo-se 9,7 g (97%) do produto. Para reação de tosilação, a agarose (9,70 g, 1 equivalente) foi solubilizada em 2 L de água a 90 °C, sob agitação. A solução foi resfriada a 30°C e em seguida foram adicionados, gota a gota, 14,5 g (11,3 equivalentes) de NaOH dissolvidos em 50 mL de água e 61 g (10 equivalentes) de cloreto de tosil (TsCl) dissolvidos em 184 mL de acetonitrila. A mistura heterogênea resultante foi agitada a 30 °C por 2 horas e etanol (6 L, 3 vezes volume) foi adicionado ao meio reacional. O precipitado foi recolhido por filtração, lavado com etanol, dialisado contra água destilada, concentrado em rotaevaporador, congelado e liofilizado, gerando 9,42 g (97%) do derivado tosil da agarose **2a**.

5.2.2 Síntese do derivado tosil da agarose **2b**

3,0 g do produto **2a** foram solubilizados em 300 mL de água a 90 °C, sob agitação. A solução foi resfriada a 30 °C e em seguida foram adicionados, gota a gota, 4,4 g (11,3 equivalentes) de NaOH dissolvidos em 15 mL de água e 18,6 g (10 equivalentes) de cloreto de tosila (TsCl) dissolvidos em 55,8 mL de acetonitrila. A mistura heterogênea resultante foi agitada a 30 °C por 2 horas e etanol (900 mL, 3 vezes volume) foi adicionado ao meio reacional. O precipitado foi recolhido por filtração, lavado com etanol, dialisado contra água destilada, concentrado em rotaevaporador, congelado e liofilizado, gerando 2,9 g (97%) do derivado tosil da agarose (**2b**).

5.2.3 Síntese do derivado azido da agarose **3a**

6,0 g (1 equivalente) do derivado **2a** foram solubilizados em 360 mL de DMSO anidro, em banho de óleo a 80 °C, sob agitação. Em seguida, foram adicionados 8,8 g (7 equivalentes) de NaN₃ ao meio reacional. A reação foi agitada em atmosfera de argônio, a 80 °C por 24 horas, e então etanol (1,08 L, 3 vezes volume) foi adicionado ao meio reacional. A mistura heterogênea foi centrifugada a 5000 rpm por 20 minutos. O material sólido recolhido foi dialisado contra água destilada, concentrado em rotaevaporador, congelado e liofilizado gerando 5,04 g (84%) do derivado azido da agarose **3a**.

5.2.4 Síntese do derivado azido da agarose **3b**

O derivado tosil da agarose **2b** (2,7 g, 1 equivalente) foi solubilizado em 180 mL de DMSO anidro, em banho de óleo a 80 °C, sob agitação. Em seguida, foram adicionados 3,76 g (7 equivalentes) de NaN₃ ao meio reacional. A reação foi agitada em atmosfera de argônio, a 80 °C por 24 horas, e então etanol (540 mL, 3 vezes volume) foi adicionado. A mistura heterogênea foi centrifugada a 5000 rpm por 20

minutos. O material sólido recolhido foi dialisado contra água destilada, concentrado em rotaevaporador, congelado e liofilizado gerando 1,50 g (52%) do derivado azido da agarose **3b**.

5.2.5 Síntese do derivado amino da agarose **4a**

5,0 g (1 equivalente) do derivado azido da agarose **3a** foram solubilizados em 300 mL de DMF a 60 °C, sob agitação. A solução foi resfriada a 30 °C, e então, foram adicionados 5 mL de água destilada, gota a gota, e 12,9 g (3 equivalentes) de trifenilfosfina (PPh_3). A reação procedeu-se sob agitação magnética, a 30 °C por 24 horas, e então, etanol (900 mL, 3 vezes volume) foi adicionado ao meio reacional. A mistura heterogênea foi filtrada em funil de placa porosa e kitassato e o material sólido recolhido foi dialisado contra água destilada, concentrado em rotaevaporador, congelado e liofilizado. Para eliminar a trifenilfosfina remanescente foi realizada ainda purificação adicional. O material sólido obtido após liofilização foi extraído em aparelho de soxhlet com etanol (300 mL) por 24 horas. O material sólido foi seco em capela a temperatura ambiente, e então liofilizado gerando por fim 3,8 g (76%) do derivado amino **4a**.

5.2.6 Síntese do derivado amino da agarose **4b**

1,44 g (1 equivalente) do derivado azido **3b** foram solubilizados em 90 mL de DMF a 60°C. A mistura resultante foi resfriada a 30 °C, e então foram adicionados 1,5 mL de água destilada, gota a gota, e 3,86 g (3 equivalentes) de PPh_3 . A reação procedeu-se sob agitação magnética, a 30 °C por 24 horas, e então etanol (270 mL, 3 vezes volume) foi adicionado ao meio reacional. A solução heterogênea foi dialisada contra etanol (4 diálises sequenciais com 250 mL, sob agitação). A solução dialisada foi rotaevaporada para eliminação do etanol e então dialisada contra água destilada. Para eliminar a trifenilfosfina remanescente foi realizada ainda purificação adicional, em aparelho de Soxhlet com extração por etanol (300 mL) por 24 horas, gerando por fim 0,778 g (52%) do derivado amino **4b**.

5.2.7 Síntese do derivado amino carboxilado **5a**

O derivado **4a** (300 mg, 1 equivalente) foi solubilizado em 40 mL de água destilada aquecida a 90 °C, sob agitação. A solução resultante foi resfriada aos poucos e então em banho de gelo foram adicionados 31 mg (0,2 equivalentes) de *N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO), 260 mL de solução tampão de NaHCO₃/Na₂CO₃, de pH 9,5 e 1,14 g (5 equivalentes) de ácido tricloroisocianúrico (TCCA). A solução foi agitada em banho de gelo por 18 horas, e então, foram adicionados 856 µL de etanol e 185 mg de NaBH₄ (5 equivalentes). A solução resultante foi agitada por 30 minutos e neutralizada com ácido acético até pH 7. A mistura foi dialisada contra água destilada, concentrada em rotaevaporador, congelada e liofilizada, gerando 133 mg (44%) do derivado **5a**.

5.2.8 Síntese do derivado amino carboxilado **5b**

O derivado **4b** (200 mg, 1 equivalente) foi solubilizado em 50 mL de água destilada aquecida a 90°C, sob agitação. A solução foi então resfriada aos poucos e então em banho de gelo foram adicionados 20,3 mg (0,3 equivalentes) de *N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO), 150 mL de solução tampão de NaHCO₃/Na₂CO₃, de pH 9,5 e 755 mg (5 equivalentes) de TCCA. A solução foi agitada em banho de gelo por 18 horas, e então, foram adicionados 570 µL de etanol, e 123 mg de NaBH₄ (5 equivalentes). A solução resultante foi agitada por 30 minutos e neutralizada com ácido acético até pH 7. A mistura foi dialisada contra água destilada, concentrada em rotaevaporador, congelada e liofilizada, gerando 100 mg (50%) do derivado **5b**.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE SÍNTESE

5.3.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear 1D e 2D foram obtidos com o espectrômetro BRUKER Avance DRX 400 operando na frequência base de 400 MHz para os núcleos de ^1H e 100 MHz para os núcleos de ^{13}C . Previamente às análises, cada amostra foi solubilizada em água deuterada (D_2O), congelada e liofilizada. As amostras foram solubilizadas nos solventes $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ e D_2O e colocadas em tubos de 5 mm de diâmetro para análise à temperatura de 70 °C. Os deslocamentos químicos foram medidos utilizando acetona como padrão interno ($\delta = 2,21$ ppm para ^1H e $\delta = 32,69$ ppm para ^{13}C) em amostras solubilizadas em D_2O , e utilizando $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ como padrão interno ($\delta = 2,63$ ppm para ^1H e $\delta = 42,01$ ppm para ^{13}C) em amostras solubilizadas neste solvente (VAN DE VELDE; ROLLEMA, 2008). Os espectros foram analisados com o auxílio dos programas TOPSPIN 3.1 e ACD/NMR Processor.

5.3.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e reflectância total atenuada (ATR/FTIR)

As análises de infravermelho foram realizadas no Departamento de Farmácia da UFPR no espectrômetro Bruker Optics, modelo Alpha, incorporado a transformada de Fourier, com acessório de reflectância total atenuada. Para as análises foram pesadas aproximadamente 2 mg das amostras e em seguida estas foram liofilizadas e lidas no aparelho. Os espectros foram analisados utilizando o programa OPUS 6.5.

5.3.3 Espectroscopia de Ultravioleta

Para realização das análises foram preparadas amostras nas concentrações de 1 mg/mL em DMSO. Os espectros de UV-visível foram obtidos no espectrofotômetro Shimadzu UV-2450 no modo de varredura 190-600nm, para obtenção do comprimento de onda máximo de absorção do produto. Este uma vez determinado, foi utilizado para as leituras subsequentes.

5.4 OUTROS MÉTODOS ANALÍTICOS

5.4.1 Método colorimétrico para identificação de grupo azido

A adaptação do método colorimétrico descrito por Gagini *et al.* (2004) foi utilizada para determinação qualitativa de grupamento azido. A primeira etapa consiste na redução do grupo azido a amino. Em um *vial*, cerca de 1 mg do polissacarídeo foi dissolvido em 1 mL de DMSO, e então, foram adicionadas 2 gotas de trifenilfosfina (PPh_3) (5% p/v em THF) e 2 gotas de água. A solução resultante foi deixada em estufa a 100 °C por 1 hora. Em seguida foram adicionadas 2 gotas de solução de ninhidrina (5% p/v em etanol) e a solução foi deixada novamente em estufa a 100 °C por 15 minutos. O aparecimento de uma coloração azulada na solução representa positividade para grupo azido.

5.4.2 Método colorimétrico para identificação de grupo amino (Teste da ninhidrina)

O teste colorimétrico da ninhidrina, para determinação qualitativa de grupo amino, foi realizado pela adaptação do método descrito para detecção de aminoácidos (YEMM; COCKING, 1955) Para acompanhamento da reação de formação do derivado amino o teste foi realizado retirando-se alíquotas de 100 μL do meio reacional (aproximadamente 1,7 mg de polissacarídeo). A esta quantidade eram adicionados, em tubo de ensaio, 2 mL de solução de ninhidrina 0,1% (p/v) em

tampão fosfato (0,01 M, pH=7,0). Para controle negativo foi utilizado 100 µL de solução contendo 17 mg de agarose, 44 mg de trifenilfosfina e 20 µL de água em 1 mL de DMSO ou DMF. Como controle positivo foi utilizado 100 µL de solução de glucosamina (1,7 mg/mL em DMSO ou DMF). Os tubos eram colocados em banho-maria fervente por 5 minutos. A coloração roxa/azulada representava positividade para o teste. Para o teste realizado no produto após purificação, à uma alíquota de 100 µL de solução do polissacarídeo (20 mg/mL) em tubo de ensaio, foram adicionados 2 mL de solução de ninhidrina (0,1% p/v) em tampão fosfato (0,01 M, pH=7,0). Para controle negativo foi utilizado 100 µL de solução de agarose em DMSO (20 mg/mL) e para controle positivo foi utilizado 100 µL de solução de glucosamina em DMSO (20 mg/mL). As soluções foram mantidas em banho-maria fervente por 5 minutos. As reações positivas demonstraram o aparecimento de coloração azul/violeta.

5.4.3 Método colorimétrico para determinação de açúcar total

A determinação de açúcar total foi realizada pelo método colorimétrico do fenol-ácido sulfúrico, descrito por Dubois *et al.* (1956). Às amostras em diferentes concentrações e solventes, foram adicionados 0,5 mL de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. O método possui sensibilidade de 10-100 µg de açúcar.

5.4.4 Dosagem de ácido urônico

A dosagem do teor de ácido urônico foi realizada pelo método descrito por Filisetti-Cozzi e Carpita (1991). As amostras foram preparadas para solução final de 400 µL. A cada tubo, foram adicionados 40 µL de ácido sulfâmico-sulfamato de potássio 4 M em pH 1,6. Esta solução é feita por meio da dissolução de 19,42 g de ácido sulfâmico em 50 mL de água destilada, acertando o pH com solução saturada de hidróxido de potássio, e em seguida 2,4 mL de H₂SO₄ em grau analítico (96,4%)

contendo tetraborato de sódio 75 mM. As amostras foram agitadas vigorosamente em vortex, e os tubos foram então aquecidos em banho-maria, a temperatura de 100 °C por 20 min. Após resfriados em banho de gelo, foi adicionado 80 µL de *m*-hidroxibifenil (0,15 % p/v) em solução de NaOH 0,5%. Após agitadas as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 525 nm. A quantificação foi realizada com o auxílio de uma curva padrão de ácido galacturônico. A sensibilidade do método é de 0,97-38,8 µg de ácido urônico em 400 µL de amostra.

5.4.5 Hidrólise dos derivados da agarose

Foi realizada hidrólise através da adaptação do método descrito por Stevenson e Furneaux (1991). À 2 mg de amostra foram adicionados 1 mL de TFA 2 M. A solução foi deixada em estufa a 120 °C por 1,5 horas, e então foi congelada e liofilizada. O resíduo obtido foi solubilizado em 100 µL de água destilada e a solução resultante (20 mg/mL) foi utilizada na detecção de monossacarídeos por cromatografia de camada delgada.

5.4.6 Cromatografia em camada delgada

Foram utilizadas cromatoplaças de alumínio revestidas com sílica gel 60, com indicador de fluorescência, da marca Merck. Após a aplicação da amostra, as cromatoplaças foram colocadas na câmara de eluição contendo como fase móvel a mistura dos solventes acetato de etila:ácido acético:propanol:água (5:2:2:2,5). A detecção dos compostos foi realizada utilizando os reveladores orcinol 0,6% (p/v) em etanol e ninhidrina 0,2 % (p/v) em etanol.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As modificações químicas foram realizadas na agarose comercial obtida da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Este polissacarídeo neutro apresenta uma estrutura dissacarídica repetitiva constituída de unidades de (1→3) β -D-galactopiranosose (G) e (1→4) 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose (LA), com hidroxilas livres nas posições de G6, G4 e G2 e em LA2 (**1**).

Com o intuito de produzir derivados com potencial aplicação biológica e farmacêutica da agarose, foi delineada uma estratégia de aminação seletiva das hidroxilas primárias (G6) através da tosilação destas hidroxilas (**2a** e **2b**), seguida de substituição nucleofílica do grupo tosila por grupamento azido (**3a** e **3b**) e posterior redução do grupo azido a amino (**4a** e **4b**). Ainda, os derivados aminados **4** foram submetidos a oxidação seletiva das hidroxilas remanescentes em G6 (**5a** e **5b**) (FIGURA 11). Todas as reações foram acompanhadas por métodos químicos e espectroscópicos e ao fim foram gerados 8 derivados da agarose que foram caracterizados por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , 1D e 2D, espectroscopia de infravermelho e ultravioleta.

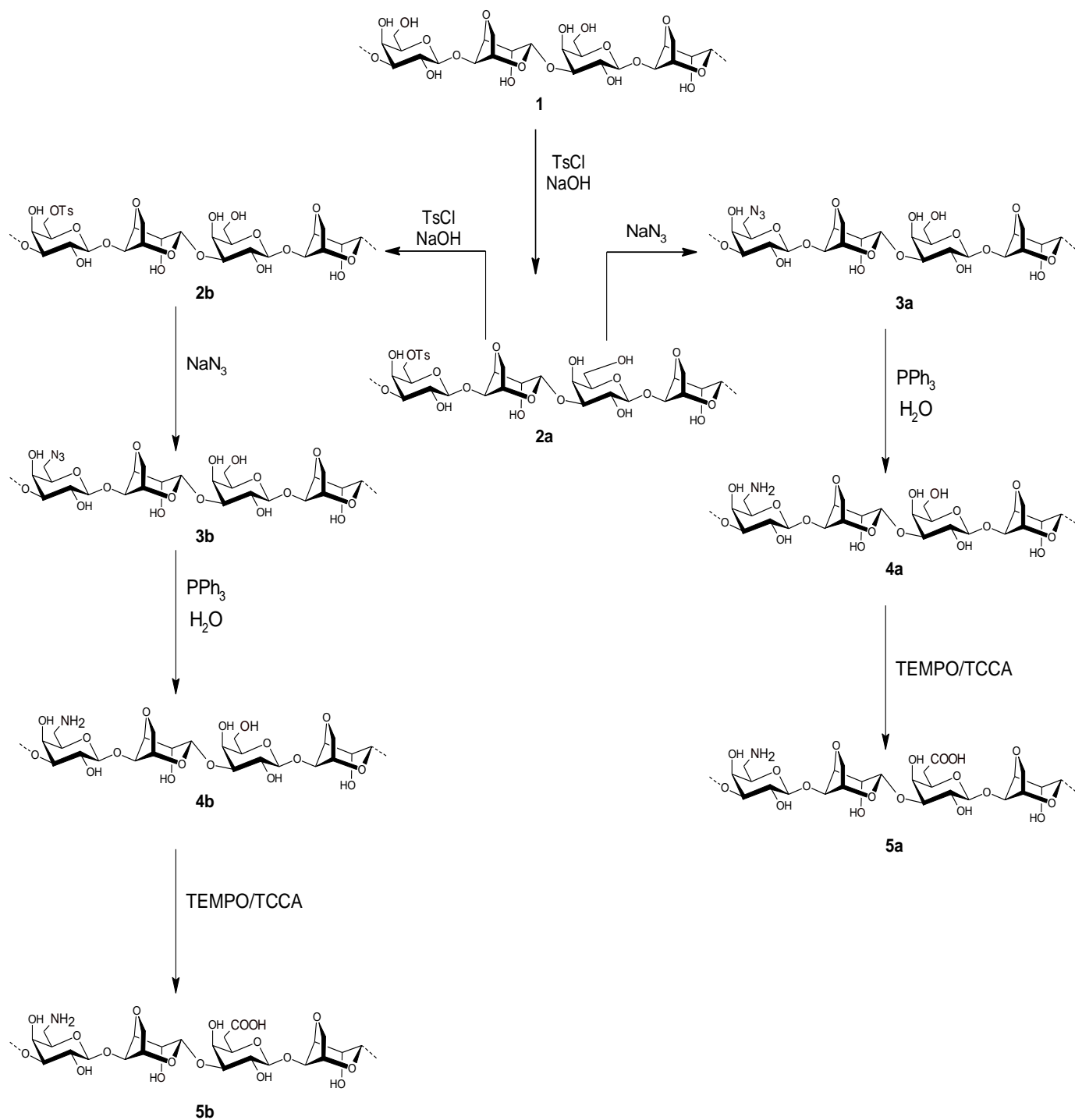


FIGURA 11 – MODIFICAÇÕES QUÍMICAS NA AGAROSE PARA OBTENÇÃO DE SEUS DERIVADOS.

FONTE: O autor (2015)

6.1 SÍNTESE DO DERIVADO TOSIL DA AGAROSE

A tosilação de alcoóis é um método extensivamente utilizado em síntese orgânica. Esta reação é geralmente realizada utilizando cloreto ou anidrido de para-toluenosulfonila na presença de base (DAS *et al.*, 2004). O grupo toсила é um excelente grupamento de saída em reações de substituições nucleofílicas, e pode, por exemplo, ser substituído por halogênios, azida, ou aminas (GERICKE, *et al.*, 2012). Neste trabalho, o interesse da síntese deste intermediário foi para posterior substituição pelo grupo azida.

Para iniciar as reações de tosilação primeiramente fez-se a redução das pontas redutoras da agarose com NaBH_4 , uma vez que se utilizaria meio básico para as próximas reações, para assim evitar a β eliminação catalisada por base e consequente degradação do polissacarídeo (ASPINALL, 1982). A redução foi feita na escala de 10 g e foi realizada pela adaptação do método descrito por Araújo *et al.* (2013).

A solução de agarose, quando resfriada em temperaturas abaixo de 30°C tem a propriedade de formação de gel. Desta forma, a adição de NaBH_4 foi auxiliada por agitação com bastão de vidro e a solução gelificada foi deixada *overnight* sem agitação a temperatura ambiente. A agarose reduzida foi então dispersa em água aquecida e o gel disperso foi colocado em membrana de diálise com auxílio de espátula. Foi gerada uma grande quantidade de gel e as diálises foram realizadas com troca diária da água destilada em balde de 10 L, por 6 dias. Após a diálise a solução foi concentrada e liofilizada, obtendo-se um produto com 97% de rendimento. O polissacarídeo reduzido obtido foi avaliado por espectroscopia de infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e HSQC, para avaliar se este se encontrava em conformidade com a agarose nativa.

Na espectroscopia de infravermelho (FIGURA 12) é possível observar algumas bandas características da agarose nativa, tais como em 3318 cm^{-1} correspondente a deformação axial da ligação O-H das hidroxilas, em 1148 cm^{-1} e 1037 cm^{-1} correspondentes a deformação axial da ligação C-O e em 934 cm^{-1} , correspondente a ligação C-O-C referente à ponte 3,6-anidro da unidade de $\alpha\text{-L}$ galactopirranose (GARCIA; VIDAL, 2000).

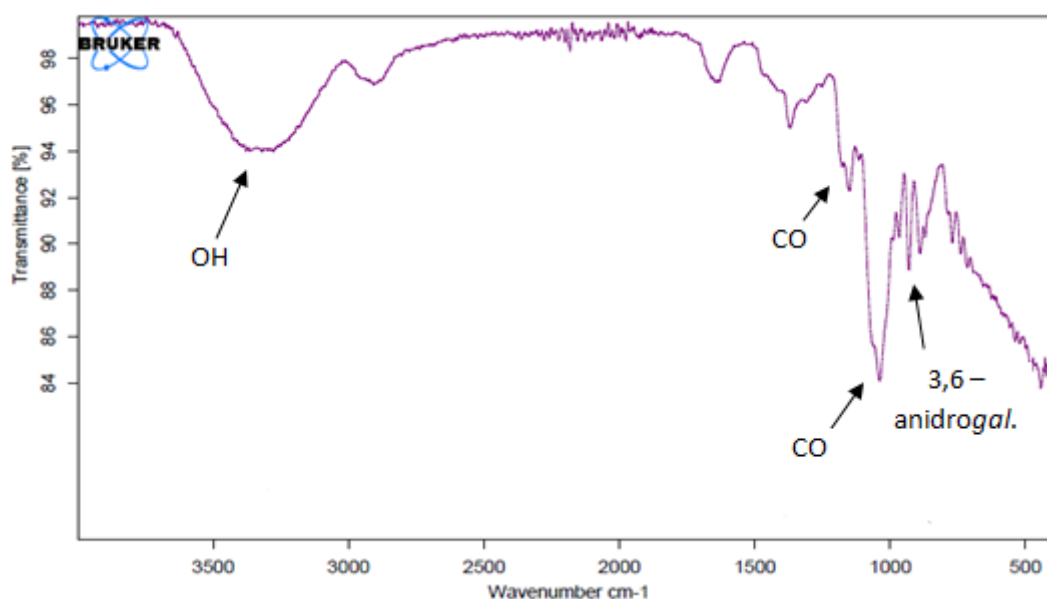


FIGURA 12 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA AGAROSE REDUZIDA
Região entre 4000 e 500 cm^{-1}
FONTE: O autor (2015)

No espectro de RMN de ^1H da agarose reduzida (FIGURA 13) observam-se os sinais dos prótons, como em 5,22 ppm correspondente a LA1; em 3,96 ppm, correspondente a LA2 e G4, em 3,58 ppm, correspondente a G2 e G5 e em 3,67 ppm correspondente a G3 e G6. Os sinais apresentados pelo espectro se encontram em concordância com os apresentados pela agarose nativa em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (GAMINI *et al.*, 1997). No espectro é possível observar, ainda, em 5,07 ppm o sinal correspondente ao hidrogênio da hidroxila ligada a G2 (GAMINI *et al.*, 1997) e em 3,25 ppm o sinal correspondente a água.

O espectro de RMN de HSQC da agarose reduzida (FIGURA 14) foi adquirido utilizando uma configuração diferente da usualmente utilizada. Nesta técnica de RMN 2D (HSQC-editado $^1\text{H}/^{13}\text{C}$) realizada os sinais correspondentes a CH_2 estão em fase invertida no espectro e a correlação entre ^{13}C e ^1H aparecem de outra cor (SASSAKI *et al.*, 2011), que neste caso é azul. A utilização deste tipo de técnica é particularmente interessante neste estudo, pois a correlação de G6 da unidade da agarose aparecerá diferenciada das demais auxiliando na observação da entrada de novos grupos na hidroxila desta posição. No espectro é possível observar as correlações de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ da agarose reduzida, como em 5,22/98,9 ppm e em 4,44/103,8 ppm correspondentes a LA1 e G1, respectivamente e em 4,05/70,2 ppm e 3,65 e 3,72/62,2 ppm correspondentes a LA6 e G6 respectivamente.

As correlações apresentadas pelo espectro corroboram com os assinalamentos para o ^1H e ^{13}C da agarose nativa (GAMINI *et al.*, 1997)

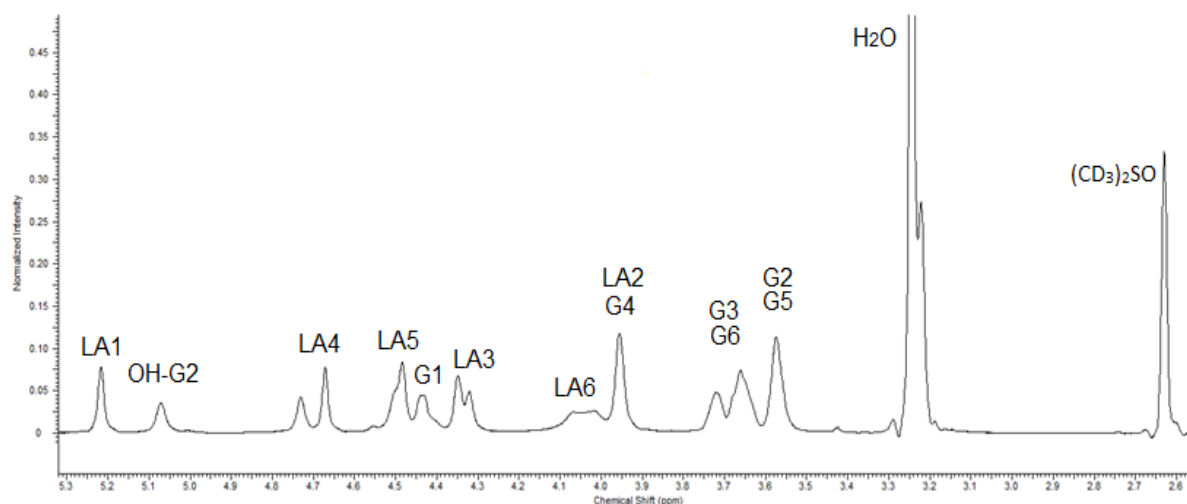


FIGURA 13 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA AGAROSE REDUZIDA

Solvente: $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (70°C); $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ como padrão interno ($\delta = 2,63$ para ^1H), Van de Velde; Rollema (2008). pH amostra = 7,0

FONTE: O autor (2015)

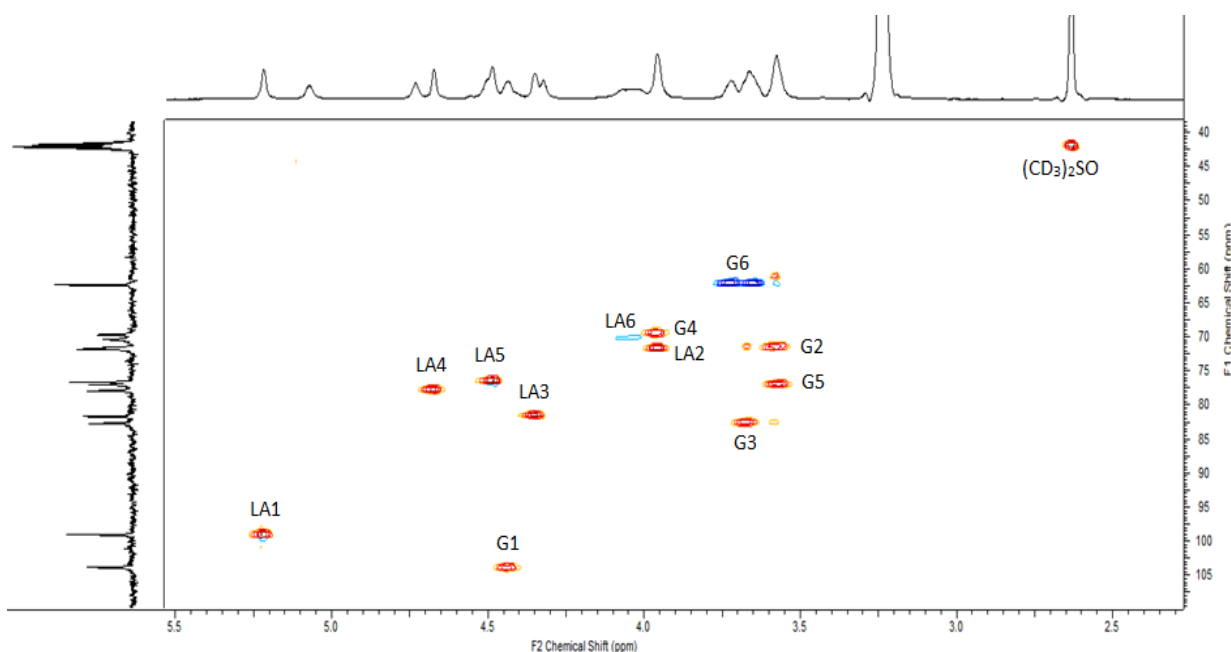


FIGURA 14 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC EDITADO DA AGAROSE REDUZIDA

Solvente: $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (70°C); $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ como padrão interno ($\delta = 2,63$ e 42,01 ppm para ^1H e ^{13}C), Van de Velde; Rollema (2008). pH amostra = 7,0

FONTE: O autor (2015)

Uma vez obtida a amostra reduzida iniciaram-se os estudos de tosilação da agarose. Através de estudos realizados por Morita *et al.* (1993), Kurita (2001) e Zampano *et al.* (2010) de tosilação da quitosana; estudos de Liu e Baumann (2002) de tosilação da celulose e da reação de tosilação da agarose descrita por Ballesteros, Montero e Sinisterra (1986) criou-se uma estratégia de síntese do derivado tosilado de agarose, através da reação em meio de solvente aprótico.

Primeiramente a reação foi testada em meio de DMSO, uma vez que o polissacarídeo apresentava boa solubilidade neste solvente, e como base foi utilizada a piridina. Inicialmente foi testada a adição de 3 equivalentes de TsCl no tempo de 24 h (amostra AGTS1). No entanto a análise de RMN de ^1H deste produto (FIGURA 15) não indicou formação do derivado tosilado. Os picos do produto eram iguais a da agarose reduzida e não foi observado nenhum pico na região aromática entre 8,0 e 7,5 ppm com correspondência ao grupo tosil. Assim fez-se outra reação, desta vez utilizando 30 equivalentes de TsCl (amostra AGTS2). No espectro de RMN de ^1H deste produto (FIGURA 16) foi observado o aparecimento de novos picos. Observa-se também o aparecimento de um novo pico na região anomérica, em 5,3 ppm, sugerindo a degradação do polissacarídeo. Ballesteros, Montero e Sinisterra (1986) também observaram a degradação da agarose ao utilizar alta quantidade de TsCl. Segundo os autores isto ocorria devido a hidrólise ácida das ligações glicosídicas, consequência da formação de HCl durante a reação e/ou da hidrólise do cloreto de tosila.

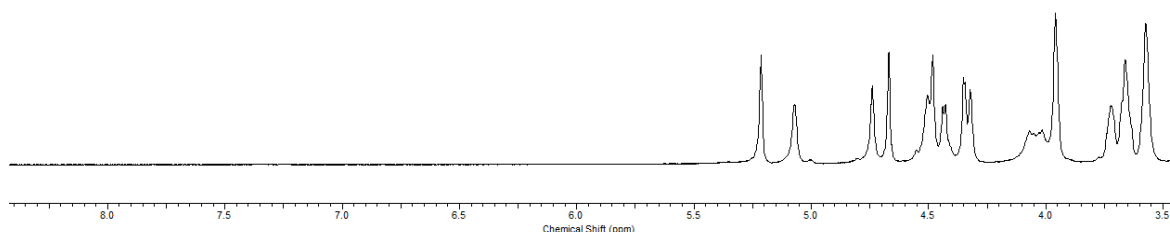


FIGURA 15 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA AMOSTRA AGTS1

Solvente: $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (70°C); $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ como padrão interno ($\delta = 2,63$ ppm para ^1H), Van de Velde; Rollema (2008). pH amostra = 7,0

FONTE: O autor (2015)

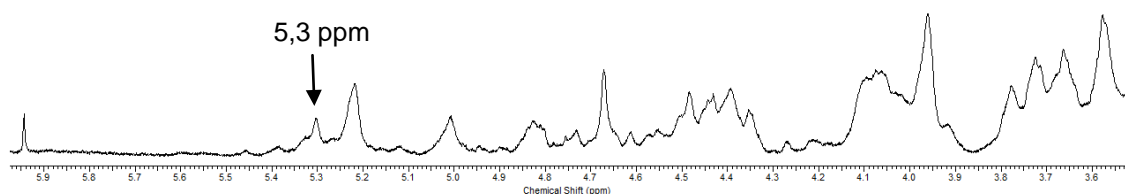
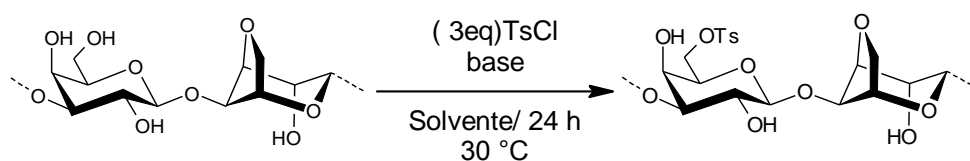


FIGURA 16 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA AMOSTRA AGTS2

Solvente: $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (70°C); $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ como padrão interno ($\delta = 2,63$ ppm para ^1H), Van de Velde; Rollema (2008). pH amostra = 7,0
 FONTE: O autor (2015)

Diante destes resultados, estudou-se a possibilidade de utilizar outros solventes para esta reação. Assim, foram testados os solventes DMF, água e acetona (TABELA 1), utilizando como base a piridina para os solventes apróticos e o NaOH para a água. Os produtos obtidos foram analisados por RMN de ^1H para avaliação da formação do derivado tosilado.

TABELA 1 – REAÇÕES DE TOSILAÇÃO DA AGAROSE EM DIFERENTES SOLVENTES



Entrada	Amostra	Solvente	Base	^a DS	^b Rendimento (%)
1	AGTS11	DMSO	Piridina	n.d.	76
2	AGTS12	DMF	Piridina	n.d.	73
3	AGTS13	Água	NaOH	0,17	51
4	AGTS14	Acetona	Piridina	n.d.	87

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: ^a Calculado por RMN de ^1H , através da equação 1, pg. 56

^b Correspondente à massa do polissacarídeo após purificação

n.d.= Não detectado tosilção.

A reação em água foi realizada com base nos os estudos de tosilação da ciclodextrina, realizada por Kong *et al.* (2010) e Li *et al.* (2011) e a reação em acetona foi realizada com base nos estudos de Ballesteros, Montero e Sinesterra (1986) de tosilação da agarose.

Inicialmente imaginou-se que a reação nos solventes orgânicos DMSO e DMF mostrariam melhores resultados, uma vez que o meio reacional se apresenta mais homogêneo nestes solventes e vários autores descreveram esta reação de tosilação em solventes orgânicos em polissacarídeos como a quitosana e a celulose (MORITA *et al.*, 1993; KURITA, 2001; ZAMPANO *et al.*, 2010). Entretanto, a formação do produto não ocorreu nas condições descritas, nestes solventes (entradas 1, 2 e 4).

O que foi observado nos experimentos foi a tosilação somente em solução aquosa (entrada 3). A reação em água reproduziu o que foi descrito por Kong *et al.* (2010) e Li *et al.* (2011), em que ao adicionar a solução de TsCl observa-se a formação de um precipitado branco. A reação, apesar de se mostrar heterogênea, obteve sucesso, sendo a água o solvente escolhido para esta reação. O espectro de RMN de ^1H do produto formado está representado na figura 17. No espectro de ^1H é possível observar o aparecimento de picos na região aromática entre 7,89 e 8,02 ppm e 7,51 e 7,65 ppm correspondentes aos hidrogênios aromáticos do grupo tosil e em 2,55 ppm um pico correspondente a metila do grupo tosil.

Para acompanhamento das reações foram utilizadas as ferramentas de RMN de ^1H e a espectroscopia de ultravioleta. A entrada de grupo tosil na estrutura da agarose foi determinada através do cálculo do grau de substituição (DS), que representa a relação de tosil por unidade dissacarídica de agarose. O cálculo do DS foi feito por RMN de ^1H através da integração dos picos gerados pelo hidrogênio do anel aromático do grupo tosil e a integração do pico correspondente ao próton H1 da unidade de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose (LA1) (FIGURA 17).

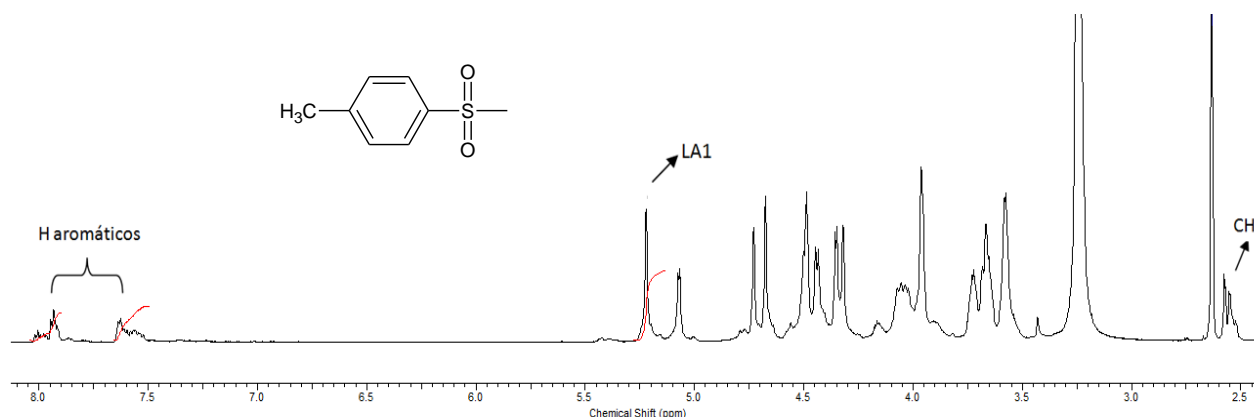


FIGURA 17 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA AMOSTRA AGTS13

Solvente: $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (70°C); $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ como padrão interno ($\delta = 2,63$ ppm para ^1H), Van de Velde; Rollema (2008)

FONTE: O autor (2015)

Uma forma similar deste cálculo de DS foi adotada por Zhao *et al.* (2012) para determinação do DS de tosil em goma guar. O cálculo utilizado está representado na equação, abaixo.

$$\text{(Equação 1)} \quad \text{DS tosil} = \frac{(A_{\text{Ph}}/4)}{\text{LA1}}$$

Em que:

A_{Ph} = Área do sinal relativo aos prótons aromáticos do grupo tosil nas regiões entre 7,89 e 8,02 ppm e 7,51 e 7,65 ppm.

LA1 = Área do sinal relativo ao próton H1 da unidade de 3,6-anidro- α -L-galactopirranose em 5,20 ppm.

O acompanhamento da reação de tosilção por espectroscopia de UV já havia sido relatado na literatura, inclusive no trabalho da tosilção da agarose realizado por Ballesteros, Montero e Sinisterra (1986). No presente trabalho o produto da reação de tosilção (AGTS13) foi submetido à varredura de UV (190-600 nm) para determinação do comprimento de onda máximo de absorção do grupo tosil. Foi utilizada ainda uma amostra de agarose que foi tosilaada anteriormente no laboratório (P9) e a agarose reduzida (FIGURA 18).

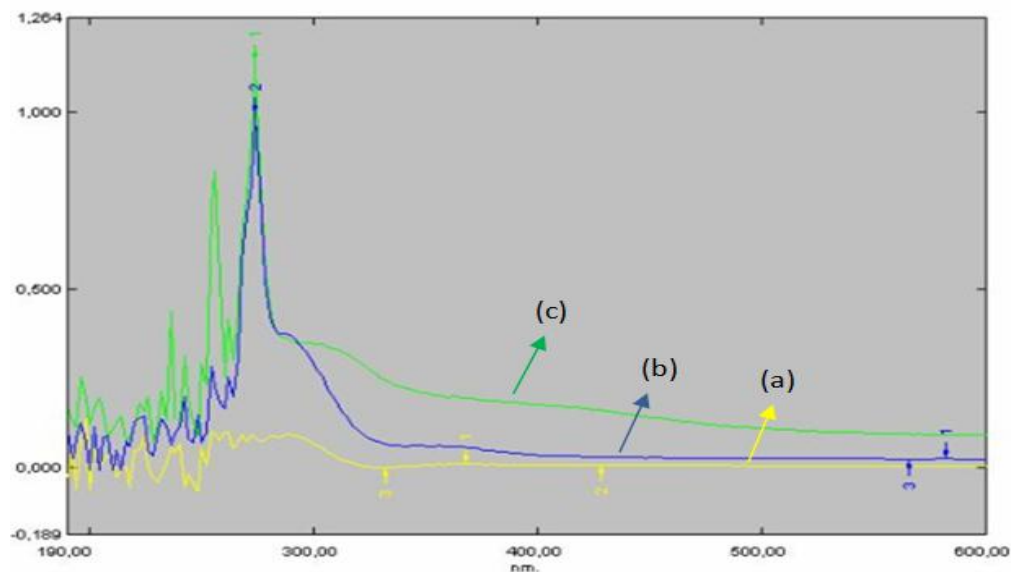


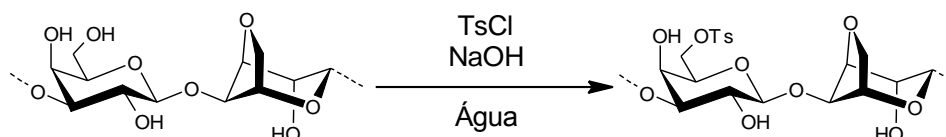
FIGURA 18 – ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-Vis DA AGAROSE NATIVA (a) E DAS AMOSTRAS TOSILADAS AGTS13 (b) e P9 (c) DISSOLVIDAS EM DMSO.
FONTE: O autor (2015)

O comprimento de onda máximo de absorção apresentado pelos produtos tosilados foi de 266 nm e a agarose reduzida não apresentou absorção neste comprimento de onda. Na tentativa de cálculo do DS por espectroscopia de UV foi feita uma curva de calibração. Inicialmente utilizou-se uma curva usando como padrão o ácido toluenosulfônico, uma vez que este apresenta estrutura muito parecida com o tosil quando ligado à molécula de agarose. Para confirmar a veracidade dos dados obtidos através da curva, estes foram inicialmente comparados com dados obtidos por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H . Os valores de DS obtidos pela técnica de espectroscopia de UV foram calculados diretamente através dos valores da absorbância das amostras e os dados obtidos apresentavam-se diferentes com relação aos obtidos pelo cálculo da integração dos picos no RMN. Assim, optou-se por montar outra curva de calibração, desta vez utilizando como padrão um dos produtos de síntese tosilados e já caracterizados por RMN.

No entanto, o acompanhamento do DS da reação por espectroscopia de UV se mostrou ineficiente. Os dados obtidos nem sempre corroboravam com aqueles obtidos através da ressonância magnética nuclear de ^1H . Dessa forma foi padronizada a utilização da espectroscopia de UV para acompanhamento das reações. Aqueles que se apresentassem potencialmente tosilados eram analisados por RMN de ^1H para determinação do DS.

Utilizando a água como solvente da reação, esta foi otimizada estudando-se várias condições, visando encontrar um bom DS de substituição pelo grupo tosil para e uma boa recuperação do polissacarídeo. Inicialmente, na estratégia de otimização (TABELA 2) foi variado o número de equivalentes de TsCl adicionados (entradas 1, 2, 3 e 4), seguido da temperatura da reação (entradas 4 e 5) e tempo de reação (entradas 3, 6 e 7). As reações foram acompanhadas por espectroscopia de ultravioleta, espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e

TABELA 2 – OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE REAÇÃO DE TOSILAÇÃO DA AGAROSE.



Entrada	Amostra	TsCl (eq.)	Tempo (h)	Temperatura (°C)	^a DS	^b Rendimento (%)
1	AGTS15	1,5	24	30	0,04	70
2	AGTS13	3	24	30	0,17	51
3	AGTS17	10	24	30	0,63	60
4	AGTS18	30	24	30	0,82	50
5	AGTS21	30	24	50	0,37	45
6	AGTS20	10	14	30	0,41	71
7	AGTS19	10	2	30	0,41	92

FONTE: O autor (2015)

NOTAS:^a Calculado por RMN de ^1H , através da equação 1, pg. 56

^b Correspondente à massa do polissacarídeo após purificação

Foi avaliada a adição de 1,5; 3; 10 e 30 equivalentes de TsCl no meio reacional preservando-se as outras condições de reação, como solvente e base utilizada, temperatura e tempo de reação. O que foi observado nestas reações foi o aumento da tosilção com o aumento do número de equivalentes de TsCl adicionados (entradas 1, 2, 3 e 4). A reação com maior DS foi, portanto, a qual foram adicionados 30 equivalentes de TsCl (entrada 4). No entanto, a condição escolhida

foi a de 10 equivalentes (entrada 3), uma vez que esta reação apresentava um bom DS e o rendimento de recuperação do polissacarídeo era maior.

Ainda com 30 equivalentes de TsCl adicionados, foi testada a reação na temperatura de 50 °C (entrada 5) para avaliação da influência do aumento da temperatura na reação. O que foi observado foi que este aumento influenciava negativamente na reação causando o decréscimo do DS (entradas 4 e 5).

Então, uma vez definido o solvente da reação como sendo a água, a quantidade de TsCl adicionado como sendo de 10 equivalentes, e a temperatura de 30 °C, o próximo parâmetro a ser avaliado foi o tempo da reação. Assim, foram estudados os tempos de 24 h, 14 h e 2 h. A reação em 14 h (entrada 6) produziu um derivado tosilado com um DS de 0,41, enquanto que a reação em 24 h (entrada 3) gerou um produto com DS de 0,63. Como foi observado que o aumento do tempo de reação diminuía a recuperação do polissacarídeo, a condição da entrada 6 foi preferencial a da entrada 3, pois apesar de apresentar menor DS, a recuperação do polímero era melhor e este DS obtido era suficiente para o objetivo do trabalho. Por fim comparando-se as condições das entradas 6 e 7, observa-se que estas apresentaram a mesma eficiência, gerando um produto de DS 0,41, dessa forma, a condição escolhida foi a da entrada 7 uma vez que haveria economia de tempo e maior rendimento de recuperação do polissacarídeo.

Assim, foi feita a reação em escala preparativa partindo-se de 9,7 g de agarose reduzida. A reação foi realizada adicionando-se solução de NaOH em água e TsCl em acetonitrila na solução de agarose. A adição de TsCl foi auxiliada pelo uso de uma bureta para assim controlar a adição gota a gota do reagente. A reação foi reprodutiva às realizadas em escala analítica, observando-se a formação de um precipitado branco ao adicionar a solução de TsCl. Ao fim, foram gerados 9,42 g (97%) do derivado tosil da agarose (**2a**).

A formação do produto **2a** foi analisada por RMN de ^1H (FIGURA 19, A) e o DS calculado para esta amostra foi de 0,25, o que se mostrou muito abaixo do esperado uma vez que as condições em escala analítica forneciam um produto de DS=0,41. A diminuição do DS pode ter ocorrido devido à diferenças práticas na reação durante o experimento. Por exemplo, a adição de TsCl em escala analítica era muito mais rápida, levando apenas alguns minutos uma vez que necessitava de um menor volume de acetonitrila para sua solubilização, enquanto que em escala preparativa a adição de TsCl levou 1 h, assim a reação foi deixada sob agitação

após completa adição do cloreto de tosila por somente 1 h (perfazendo o tempo total estipulado para a reação de 2 h). Além disso, o que também pode ter auxiliado na redução do DS na reação preparativa é o volume reacional. Para reação em escala preparativa foram utilizados 1 L de água e para a reação em escala analítica foram utilizados 10 mL de água. Este aumento do volume do meio reacional pode ter dificultado a agitação magnética, contribuindo para a formação de um produto de baixo grau de substituição por grupos tosila.

Como este grau de substituição foi abaixo do esperado, foi utilizada uma parte da amostra tosilada **2a** para uma retosilação, objetivando aumentar o DS da reação. Assim com 3,0 g da amostra **2a** repetiu-se o processo de tosilação nas condições otimizadas e foi gerado 2,9 g (97%) do produto **2b**. Este novo produto obtido foi então submetido a análise por RMN de ^1H (FIGURA 19, B) e apresentou um DS de 0,91 (calculado a partir da equação 1, pg. 56). Este valor de DS demonstrou a eficiência do processo de retosilação. Houve um aumento considerável no conteúdo de grupos tosila e, no entanto não houve diminuição do rendimento de recuperação do polissacarídeo.

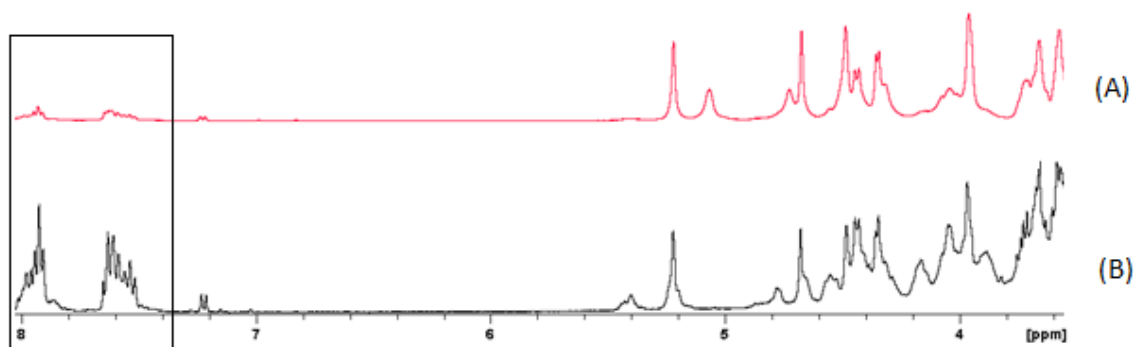


FIGURA 19: ESPECTROS DE RMN DE ^1H DOS PRODUTOS **2a** (A) e **2b** (B).

Solvente: $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (70°C); $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ como padrão interno ($\delta = 2,63$ ppm para ^1H), Van de Velde; Rollema (2008)

FONTE: O autor (2015)

6.1.1 Caracterização química do derivado tosil da agarose

Para caracterização do derivado tosil da agarose, foi utilizada a amostra AGTS18 (entrada 4, tabela 2). Foram realizados experimentos de espectroscopia de infravermelho e RMN unidimensionais e bidimensionais.

Na espectroscopia de infravermelho (FIGURA 20) é possível observar a presença de uma nova banda em 1174 cm^{-1} , característica do estiramento simétrico da ligação $\text{O}=\text{S}=\text{O}$ (MORITA *et al.*, 1994; HEINZE *et al.*, 2000; GERICKE *et al.*, 2012) confirmando a entrada do grupo tosil no polissacarídeo.

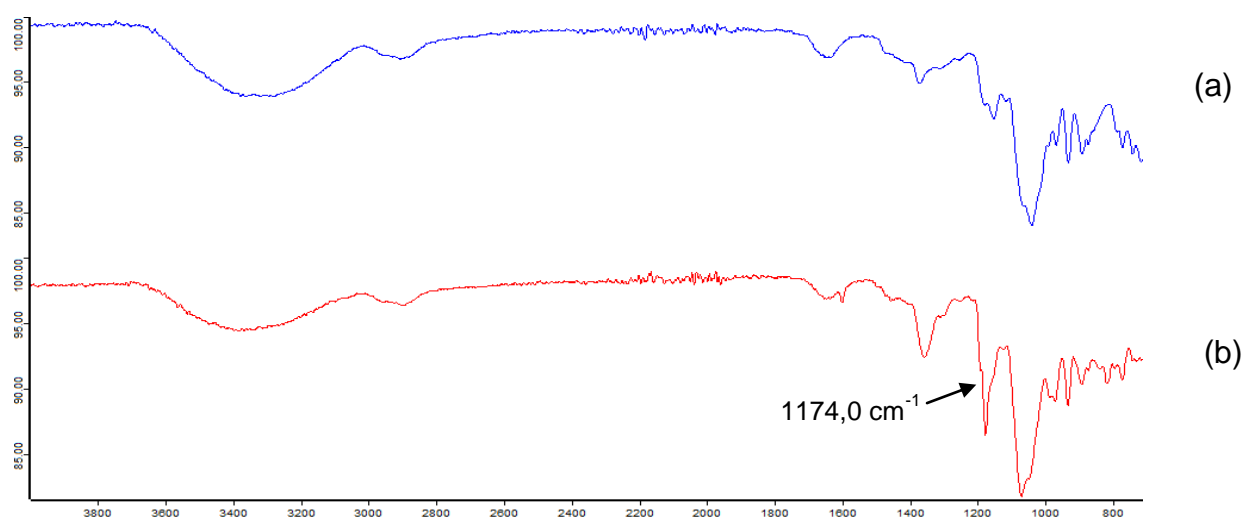


FIGURA 20 – ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DAS AMOSTRAS AGAROSE REDUZIDA (a) E AGTS18 (b)

Região entre $4000\text{--}800\text{ cm}^{-1}$

FONTE: O autor (2015)

No espectro de HSQC editado da amostra (FIGURA 21a) é possível observar correlações em 2,55/22,9; 7,91/129,3 e 7,60/131,7 ppm, correspondentes a metila e anel aromático do grupo tosil respectivamente. Na região de carboidratos (FIGURA 21b) foi observado o deslocamento do sinal de G6 da unidade A de 3,65 e 3,72/62,2 ppm para 4,15 e 4,29/70,9 ppm, indicando a entrada do grupo tosil nesta posição (*alfa-shift*). Outros polissacarídeos tosilados na hidroxila primária (C6) relatados na literatura também apresentaram um deslocamento de aproximadamente 9 ppm do sinal do carbono (HEINZE *et al.*, 2000; LIU e BAUMANN, 2002; GERICKE *et al.*, 2012). É observado ainda o deslocamento de G5 de 3,57/ 76,9 ppm para 3,85/73,4

ppm (*beta-shift*), devido a entrada do grupo tosil em G6, o que foi confirmado pelo espectro de HMBC (FIGURA 22) em que foi observado a correlação em 4,15/73,3 ppm entre o ^{13}C de G5 da unidade 6-O-toluenosulfonil- β -D-galactopiranosose com o ^1H de G6. Além disso, no espectro de HSQC da amostra (FIGURA 21b) é observado que a tosilação em G6 causa um efeito em G4, gerando o deslocamento deste de 3,96/ 69,5 ppm para 3,86/69,1 ppm, o que é confirmado pelo HMBC (FIGURA 22) na correlação de 3,82/70,0 ppm que representa a correlação entre o ^{13}C de G6 desta mesma unidade com o ^1H de G4.

No entanto, a análise do espectro mostra que apesar da tosilação ser preferencial em G6 esta não foi seletiva para esta posição. Várias correlações novas surgiram no espectro de HSQC, indicando que ocorreu tosilação em outras hidroxilas do polissacarídeo. Pelo estudo do espectro de HSQC, utilizando o trabalho de tosilação não seletiva da celulose (LIU e BAUMANN, 2002), bem como estudos de dessulfatação de galactanas sulfatadas (KOLENDER e MATULEWICZ, 2004) para comparação, uma vez que o grupo sulfato apresenta perfis de deslocamentos parecidos com o grupo tosil, e o auxílio da técnica de RMN de HMBC, foi possível realizar o assinalamento de todas as correlações. Dessa forma a correlação existente em 5,39/96,8 ppm (FIGURA 21b) foi atribuída ao deslocamento de LA1 quando a posição LA2 encontrava-se tosilada (β *shift* de LA1). Deslocamentos semelhantes foram observados no C1 da celulose, quando o C2 estava tosilado (LIU e BAUMANN, 2002). O deslocamento de LA2 foi de 3,96/71,7 ppm para 4,39/79,2 ppm (*alfa-shift*) (FIGURA 21b) e resultado da tosilação nessa posição foi possível observar uma correlação em 4,53/76,5 (FIGURA 21b) consequência do deslocamento de LA3, o que se confirma pelo HMBC da amostra (FIGURA 22) em que em 4,52/96,6 ppm observa-se a correlação entre o ^{13}C de LA1 da unidade de 3,6-anidro-2-O-toluenosulfonil- α -L-galactopiranosose com o ^1H de LA3.

No espectro da figura 21b também é possível observar uma correlação em 4,75/77,9 ppm que foi atribuído à tosilação em G4. Neste caso, houve um deslocamento de aproximadamente 9 ppm para o ^{13}C e 0,8 ppm para o ^1H . Deslocamentos similares foram encontrados em carragenanas que apresentam G4 sulfatado comparadas a esta posição não sulfatada (KOLENDER, MATULEWICZ, 2004). Ainda, foi observado no espectro de HSQC uma única correlação de G1 (4,44/103,5 ppm), similar a encontrada na agarose nativa.

Estes dados sugerem que não houve tosilção de G2, sugerindo que esta hidroxila está menos disponível para reagir com o cloreto de tosil nas condições de reação testadas.

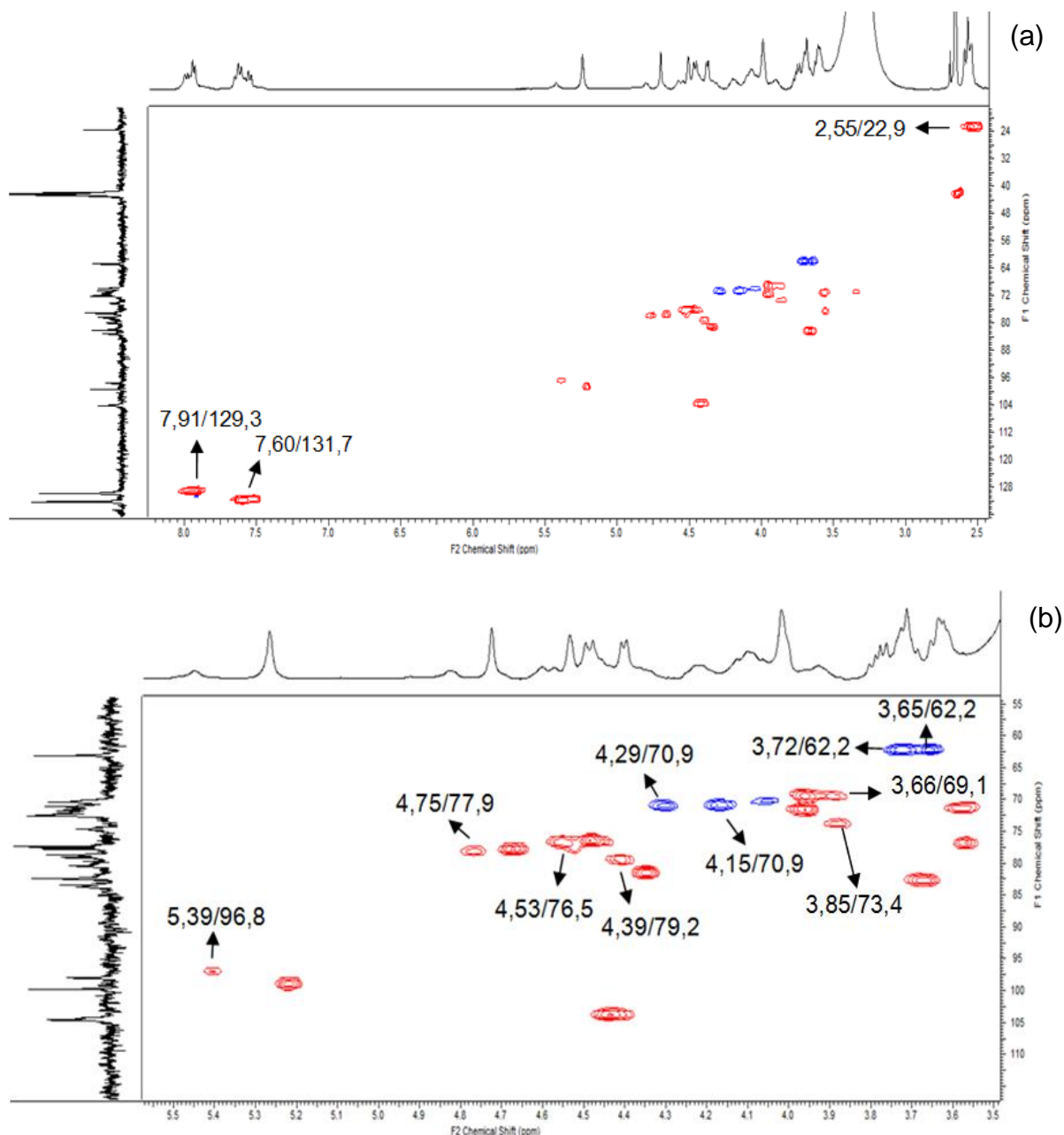


FIGURA 21 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC EDITADO DA AMOSTRA AGTS18

(a) Região de 8,1-2,0ppm; (b) Região de 5,5-3,4ppm

Solvente: $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (70°C); $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ como padrão interno ($\delta = 2,63$ e $42,01$ ppm para ^1H e ^{13}C), Van de Velde; Rollema (2008). pH amostra = 7,0

FONTE: O autor (2015)

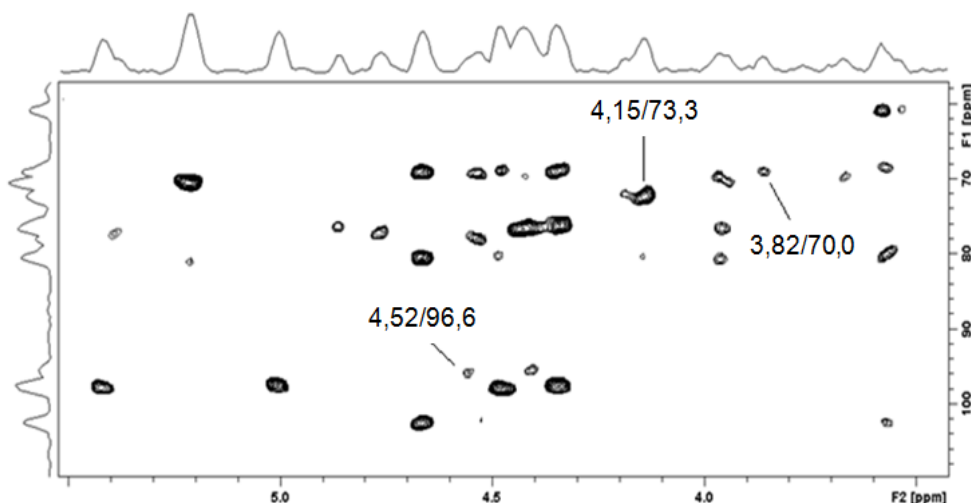


FIGURA 22 - ESPECTRO DE RMN DE HMBC DA AMOSTRA AGTS18

Solvente: $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (70°C). pH amostra = 7,0

FONTE: O autor (2015)

Com todos os dados obtidos por ressonância magnética nuclear foi possível montar uma tabela com os assinalamentos da díade com substituição da hidroxila de G6 pelo grupamento tosila (TABELA 3).

Uma vez determinado os deslocamentos químicos dos principais substituintes da agarose foram utilizados os espectros de RMN de ^1H para cálculo do DS de tosila em cada uma das posições tosiladas das amostras **2a** e **2b**, através das seguintes equações:

$$\text{(Equação 2)} \quad \text{DS G6 tosila} = \frac{\text{G6tos}}{(\text{LA1} + \text{LA1}\beta)}$$

$$\text{(Equação 3)} \quad \text{DS A2 tosila} = \frac{\text{LA1}\beta}{(\text{LA1} + \text{LA1}\beta)}$$

$$\text{(Equação 4)} \quad \text{DS G4 tosila} = \text{DS tosila total} - (\text{DS G6 tosila} + \text{DS A2 tosila})$$

Em que:

G6tos = Área do sinal relativo a um dos prótons H6 da unidade de 6-O-toluenosulfonil- β -D-galactopiranosose em 4,15 ppm

LA1 = Área do sinal relativo ao próton H1 da unidade de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose em 5,20 ppm

LA1 β = Área do sinal relativo ao próton H1 da unidade de 3,6-anidro-2-O-toluenosulfonil- α -L-galactopiranosose em 5,39 ppm

Para a amostra **2b**, através do cálculo de DS de G6 tosila, representado na primeira equação 2, obteve-se o valor de 0,57. Para a tosilação em LA2 (equação 3) o DS calculado foi de 0,26 e para tosilação em G4 (equação 4) foi de 0,07.

Os derivados tosila da agarose **2a** e **2b** produzidos neste trabalho, foram obtidos com graus de substituição de grupo tosila de 0,25 e 0,91 respectivamente. A amostra de DS menor **2a** mostrou tosilação somente em G6, enquanto que a amostra com DS maior **2b** apresentou tosilação em LA2, G4 e G6. Na amostra **2b** esta tosilação, apesar de não ser seletiva, se mostrou preferencial para G6 (DS=0,57) e em menor grau nas outras posições (LA2 e G4). O DS obtido neste trabalho mostrou-se como um bom resultado, sobretudo por alcançar tal modificação na agarose que é um polissacarídeo difícil de modificar, devido principalmente à suas propriedades físico-químicas.

Ballesteros, Montero e Sinisterra (1986) realizaram a tosilação da agarose em meio de acetona e utilizando piridina como base. Segundo os autores o uso do cloreto de tosila é interessante como agente ativante da agarose para imobilização de ligantes e proteínas. Assim, neste trabalho o objetivo da tosilação foi a ativação do polissacarídeo para posterior acoplamento covalente de ligantes por deslocamento nucleofílico dos grupos tosila. Eles realizaram o acoplamento da agarose tosila com a lisina e com a nuclease de *Staphylococcus aureus*. Os autores alcançaram, em condições otimizadas, 89µmol de TsCl por grama de gel seco de agarose, e conseguiram realizar o acoplamento aos ligantes desejados. Anteriormente Nilsson e Mosbach (1980) também fizeram o acoplamento da agarose ativada por cloreto de tosila ao inibidor de tripsina de soja. Estes autores em condições otimizadas, alcançaram 1,15 mmol de TsCl por grama de gel seco de agarose.

No presente trabalho foi alcançado uma quantidade de 2,97 mmol de TsCl por grama de agarose para a amostra **2b**, resultado muito superior aos relatados por estes autores. O derivado tosila de agarose sintetizado apresenta ampla gama de aplicações e a otimização das condições para tosilação deste polissacarídeo se mostraram promissoras.

TABELA 3 – ASSINALAMENTOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C DAS DIADES DE AGAROSE NATIVA E C6 TOSILADA

^a Deslocamentos químicos (ppm) $^{13}\text{C}/^1\text{H}$							
Amostra	^b Un.	1	2	3	4	5	6
Nativa	G	103,8	71,5	82,6	69,5	76,9	62,2
		4,44	3,58	3,67	3,96	3,57	3,65/3,72
	LA	98,9	71,7	81,6	77,8	76,5	70,2
		5,22	3,96	4,35	4,67	4,48	4,05
Tosil	G6Ts	103,5	71,2	82,3	69,1	73,4	70,9
		4,42	3,56	3,66	3,94	3,85	4,15/4,29
	LA	98,5	71,3	81,1	77,6	76,2	70,0
		5,20	3,94	4,33	4,66	4,47	4,03

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: ^a Foi utilizado o solvente $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ como padrão interno ($\delta = 2,63$ e $42,01$ ppm para ^1H e ^{13}C respectivamente, Van de Velde e Rollema (2008), pH amostra = 7,0

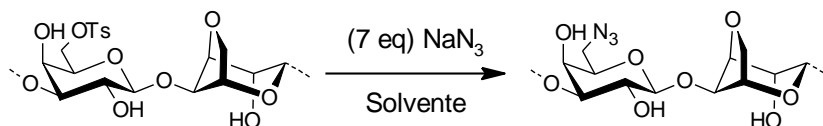
^b Os códigos de letras referem-se à nomenclatura desenvolvida por Knutsen *et al* (1994). G6Ts = 6-O-toluenosulfonil- β -D-galactopirranose

6.2 SÍNTESE DO DERIVADO AZIDO DA AGAROSE

Uma vez gerado os derivados tosil da agarose **2a** e **2b**, foi realizado a substituição do grupo tosil em G6 por um grupamento azido (FIGURA 11, p. 48). Esta reação foi baseada em estudos realizados por Satoh *et al.* (2006) e Fox e Edgard (2012) que sintetizaram os derivados azidos da quitosana e da celulose respectivamente.

A otimização desta reação foi realizada estudando-se os seguintes parâmetros: solvente (entradas 1 e 2, tabela 3) e tempo da reação (entrada 1 e 3, tabela 3). As reações foram feitas utilizando a amostra **2a**.

TABELA 4 – OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DO DERIVADO AZIDO DA AGAROSE



Entrada	Amostra	Solvente	Tempo (h)	Rendimento ^a (%)
1 ^b	AGN33	DMSO	24	93
2 ^c	AGN34	Água	24	80
3 ^b	AGN35	DMSO	48	72

FONTE: O autor (2015)

NOTAS:^a Correspondente à massa do polissacarídeo após purificação.

^b Reação realizada com 50 mg de agarose e 73 mg de azida de sódio em 3 mL de DMSO, a 80 °C e atmosfera de argônio.

^c Reação realizada com 50 mg de agarose e 73 mg de azida de sódio em 5 mL de água, a 80 °C e atmosfera de argônio.

Para acompanhar a formação do derivado azido da agarose nas reações foram utilizadas a reação colorimétrica para determinação do grupo azido adaptada do método descrito por Gaggini *et al.* (2004) e análises de RMN de ¹H. A reação colorimétrica para determinação de grupo azido é baseada na reação de redução do grupo azido com PPh₃, e posterior detecção do grupo amino resultante através da reação com a ninhidrina. Todas as amostras foram avaliadas comparando-se a um controle positivo, que consistia em uma solução de 1 mg/mL de glucosamina em DMSO. Como a glucosamina tem o grupo amino para reagir com ninhidrina, ela foi usada como controle positivo da reação. Assim a cor azulada para glucosamina indica positivo para grupo amino e para os polissacarídeos testados indica a presença do grupo azido que foi reduzido a amino. Na figura 23, estão mostrados os resultados para o teste de determinação do grupo azido para as reações de otimização (TABELA 4).

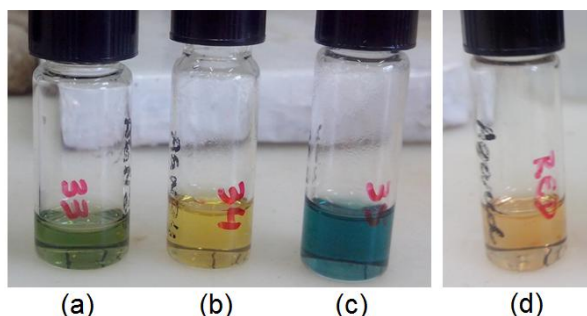


FIGURA 23 - REAÇÃO COLORIMÉTRICA PARA DETERMINAÇÃO DO GRUPO AZIDO.

Amostra AGN33 (a); amostra AGN34 (b); amostra AGN35 (c); e agarose reduzida (d).

FONTE: O autor (2015)

A reação colorimétrica indicou formação do derivado azido nas amostras produzidas em DMSO AGN33 (a) e AGN35 (c). A reação realizada em meio aquoso AGN34 (b) não apresentou coloração positiva, o que pode ter ocorrido devido a concorrência da água com a azida para substituição do grupo tosila.

As amostras também foram analisadas por RMN de ^1H . No espectro de RMN procurava-se a redução ou ausência dos sinais aromáticos do tosila nas regiões ente 7,89 e 8,02 ppm e 7,51 e 7,65 ppm, indicando substituição deste grupamento pelo grupo azido. Os espectros obtidos para as reações de otimização estão representados na figura 24. Pela análise dos espectros observa-se que houve diminuição dos hidrogênios do grupo tosila na região aromática. Através do cálculo do DS de tosila (calculado pela equação 1, pg. 56), observou-se uma diminuição do DS de 0,25 para 0,05 para as três amostras (b, c e d, FIGURA 24). Assim, os espectros de RMN indicaram que houve substituição do grupo tosila, entretanto esta substituição não foi completa. A redução dos grupos tosila no espectro de RMN ^1H da amostra AGN34 em conjunto com o resultado negativo no teste colorimétrico sugere a substituição do grupo tosila pela hidroxila da água, retornando assim à estrutura da agarose nativa.

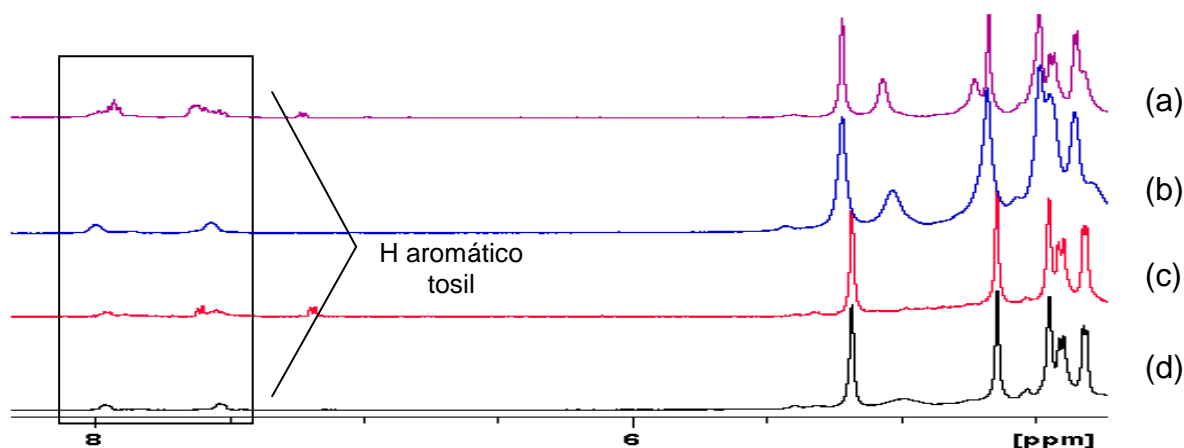


FIGURA 24 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ^1H DAS AMOSTRAS AGAROSE 2a (a), AGN33 (b), AGN34 (c) E AGN35 (d).

Solvente: $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (70 °C); $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ como padrão interno ($\delta = 2,63$ ppm para ^1H), Van de Velde; Rollema (2008)

FONTE: O autor (2015)

Diante dos resultados apresentados pela colorimetria para determinação do grupo azido e pelo RMN de ^1H , escolheu-se a condição da entrada 1 da Tabela 3 como condição para síntese em escala preparativa, uma vez que aparentemente o tempo de 24 h e 48 h apresentava a mesma eficiência de formação do produto, optando-se assim pelo menor tempo.

Assim, foram sintetizados os derivados **3a** e **3b** a partir dos derivados **2a** e **2b** respectivamente (FIGURA 11, p. 48). A reação com o derivado **2a** foi feita na escala de 6,0 g e gerou 5,04 g (84%) do derivado azido da agarose **3a**. A reação com o derivado tosil da agarose **2b** foi feita na escala de 2,7 g e gerou 1,50 g (52%) do derivado azido da agarose **3b**. O teste colorimétrico para determinação do grupo azida mostrou resultado positivo para as duas frações (FIGURA 25).



FIGURA 25 – REAÇÃO COLORIMÉTRICA PARA DETERMINAÇÃO DO GRUPO AZIDO NAS AMOSTRAS AGAROSE REDUZIDA (a), **3a** (b) E **3b** (c).

FONTE: O autor (2015)

6.2.1 Caracterização química dos derivados azido da agarose **3a** e **3b**

Os produtos **3a** e **3b** sintetizados foram caracterizados através de espectroscopia de infravermelho e RMN de ^1H e HSQC. No espectro de infravermelho da amostra **3a** (FIGURA 26) a banda referente ao estiramento da ligação entre os nitrogênios do grupo azido $-\text{N}_3$ em aproximadamente 2100 cm^{-1} (SILVERSTEIN *et al.*, 1994) aparece muito fracamente, no entanto é possível observar a redução significativa da banda em $1174,24\text{ cm}^{-1}$ correspondente ao estiramento simétrico do $-\text{SO}_2$ do grupo tosila. O espectro de infravermelho da amostra **3b** (FIGURA 27) mostrou o aparecimento da banda do grupo azido em 2106 cm^{-1} , no entanto a banda correspondente ao SO_2 do tosila reduz menos, sugerindo que ainda há presença deste grupo no polissacarídeo.

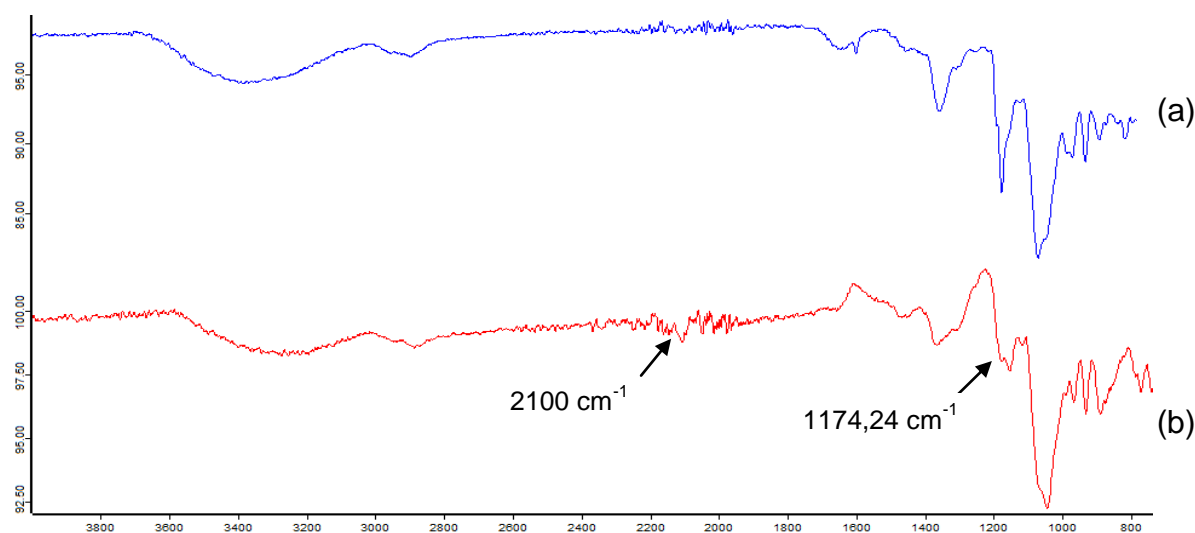


FIGURA 26 –ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DAS AMOSTRAS **2a** (a) e **3a** (b)
Região $4000\text{--}800\text{ cm}^{-1}$
FONTE: O autor (2015)

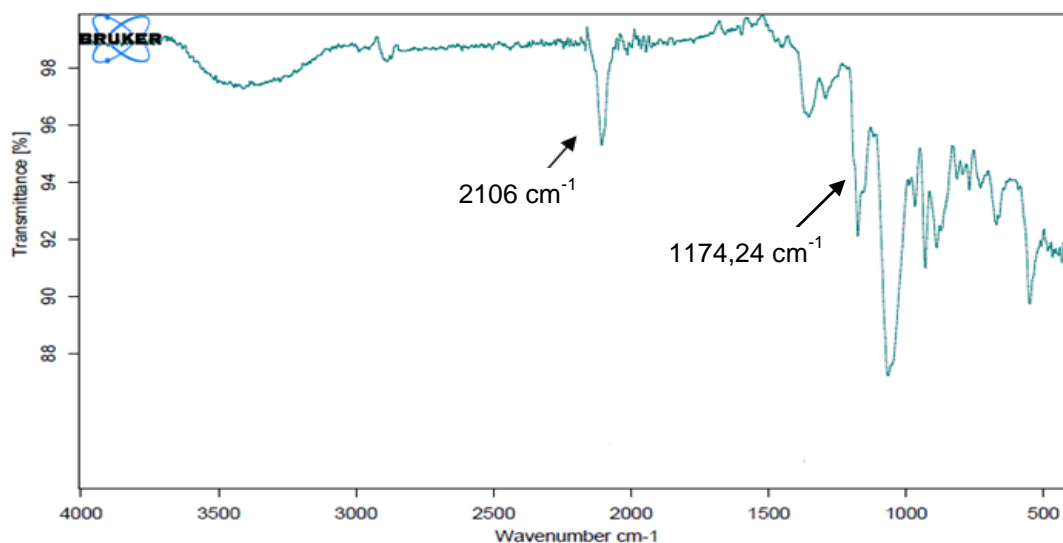


FIGURA 27 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA AMOSTRA **3b**

Região 4000-500 cm^{-1}

FONTE: O autor (2015)

A análise dos espectros de RMN de ^1H das amostras preparativas **3a** e **3b** (FIGURA 28 e 29) indicou uma diminuição do grupo tosil, em virtude da substituição pelo grupamento azido. Para amostra **3a** (FIGURA 28) o cálculo do DS de tosil (equação 1, pg.56) mostrou uma diminuição de 0,25 para 0,05, assim o DS de azido foi calculado em aproximadamente 0,20, condizente com os resultados obtidos nas reações analíticas de otimização. Ainda no espectro é possível observar o desaparecimento do sinal em 4,15 ppm, correspondente a um dos H6 da unidade 6-O-toluenosulfonil- β -D-galactopiranoose, indicando a saída do grupo tosil nesta posição do polissacarídeo.

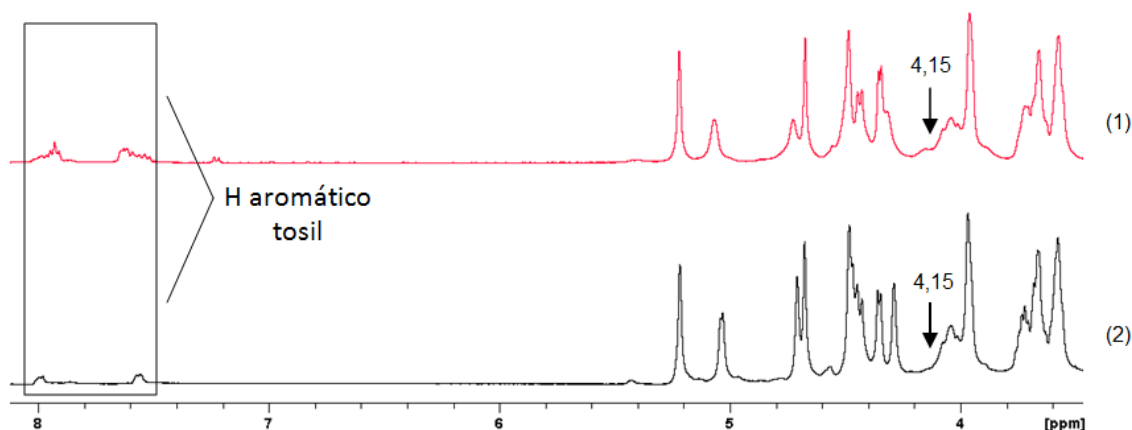


FIGURA 28 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ^1H DO DERIVADO TOSIL **2a** (1) E DERIVADO AZIDO **3a** (2)

Solvente: $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (70 °C); $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ como padrão interno ($\delta = 2,63$ ppm para ^1H), Van de Velde; Rollema (2008)

FONTE: O autor (2015)

Da mesma forma, a integração e cálculo do DS do grupo tosila para a amostra **3b** (equação 1, pg.56) mostrou uma redução de 0,91 para 0,40 (FIGURA 29), indicando ainda uma quantidade de tosila não substituído por azida na estrutura do polímero. No espectro é possível observar também o desaparecimento do sinal em 4,15 ppm, indicando que esta substituição foi preferencial no grupo tosila em G6 da estrutura da agarose. Assim, para esta amostra, o DS de azido calculado foi de 0,51, resultado da subtração do DS de tosila do substrato (0,91) e o DS de tosila que permaneceu após reação com a azida de sódio (0,40).

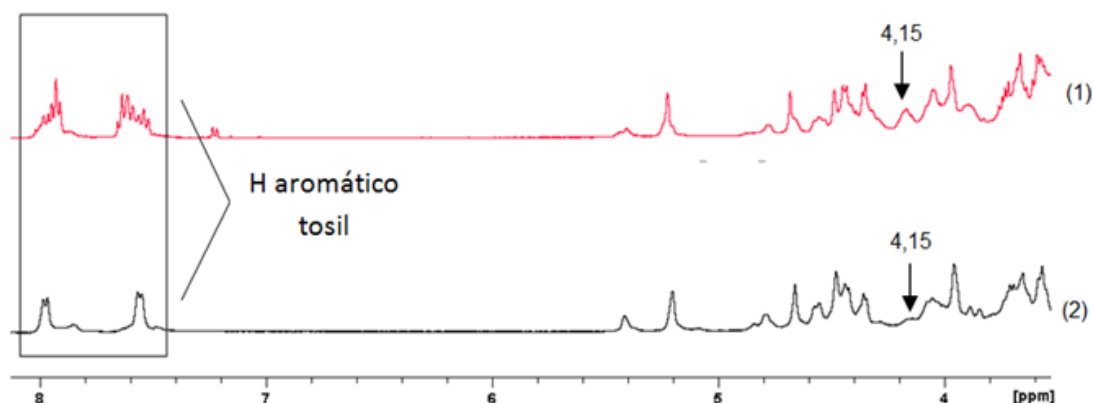


FIGURA 29 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ^1H DO DERIVADO TOSIL**2b** (1) E DERIVADO AZIDO **3b** (2)

Solvente: $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (70 °C); $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ como padrão interno ($\delta = 2,63$ ppm para ^1H), Van de Velde; Rollema (2008)

FONTE: O autor (2015)

No espectro de RMN de HSQC da amostra **3b** (FIGURA 30) é possível confirmar a entrada do grupo azido na posição G6 do polissacarídeo, através do desaparecimento da correlação em 4,15 e 4,29/70,9 ppm, correspondente a unidade de 6-O-toluenosulfonil- β -D-galactopiranosose e o aparecimento da correlação em 3,49 e 3,61/52,9 ppm, correspondente a unidade de 6-azido-6-desoxi- β -D-galactopiranosose. Outros polissacarídeos substituídos por grupo azido nesta posição apresentaram deslocamentos semelhantes (CIMECIAGLU *et al.*, 1994; CIMECIAGLU *et al.*, 1997; SATOH *et al.*, 2006; ZAMPANO *et al.*, 2010; FOX; EDGAR, 2012). No espectro é observado ainda o deslocamento de G5 da unidade de 6-O-toluenosulfonil- β -D-galactopiranosose de 3,85/73,4 ppm para 3,78/75,1 ppm, devido a entrada do grupo azido em G6, o que também corrobora com dados encontrados na literatura (CIMECIAGLU *et al.*, 1994). O espectro mostra ainda as correlações em 5,39/96,8 4,39/79,2 e 4,53/76,5 ppm, atribuídas a LA1, LA2 e LA3 respectivamente da unidade de 3,6-anidro-2-O-toluenosulfonil- α -L-galactopiranosose. Em 4,75/77,9 ppm foi observado a correlação atribuída à tosilação em G4 da unidade A da agarose. Estes dados indicam que o grupamento tosila nestas posições não foi substituído pela azida.

No espectro de HSQC da amostra **3a** (FIGURA 31) não foi possível observar a correlação correspondente a entrada do grupo azido na posição G6 em 3,49 e 3,61/52,9 ppm. Entretanto foi possível observar o desaparecimento da correlação em 4,15 e 4,29/70,9 ppm atribuída a G6 da unidade de 6-O-toluenosulfonil- β -D-galactopiranosose. Acredita-se que o baixo valor de DS para o grupo azido, associado às características físico-químicas da agarose tenham prejudicado a visualização do sinal. Com base na análise dos espectros de RMN da amostra **3b** foi então sugerido os assinalamentos de ^1H e ^{13}C para a díade contendo o grupamento azido em G6 da agarose (TABELA 5).

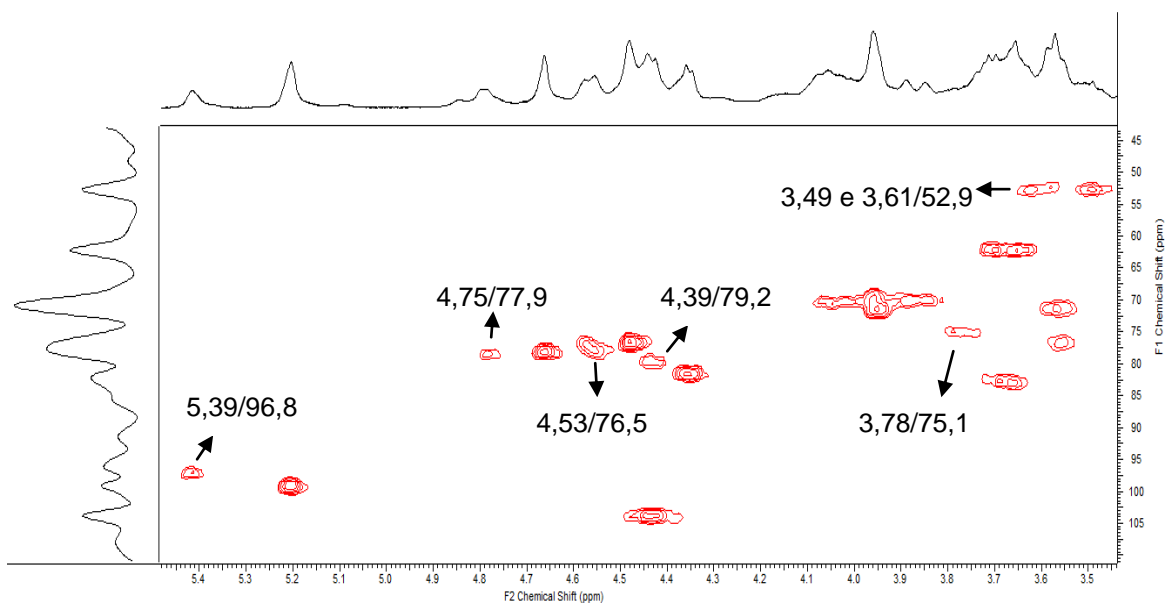


FIGURA 30 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA AMOSTRA 3b

Solvente: $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (70°C); $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ como padrão interno ($\delta = 2,63\text{ppm}$ para ^1H e $42,01\text{ppm}$ para ^{13}C), Van de Velde; Rollema (2008). pH amostra = 7,0

FONTE: O autor (2015)

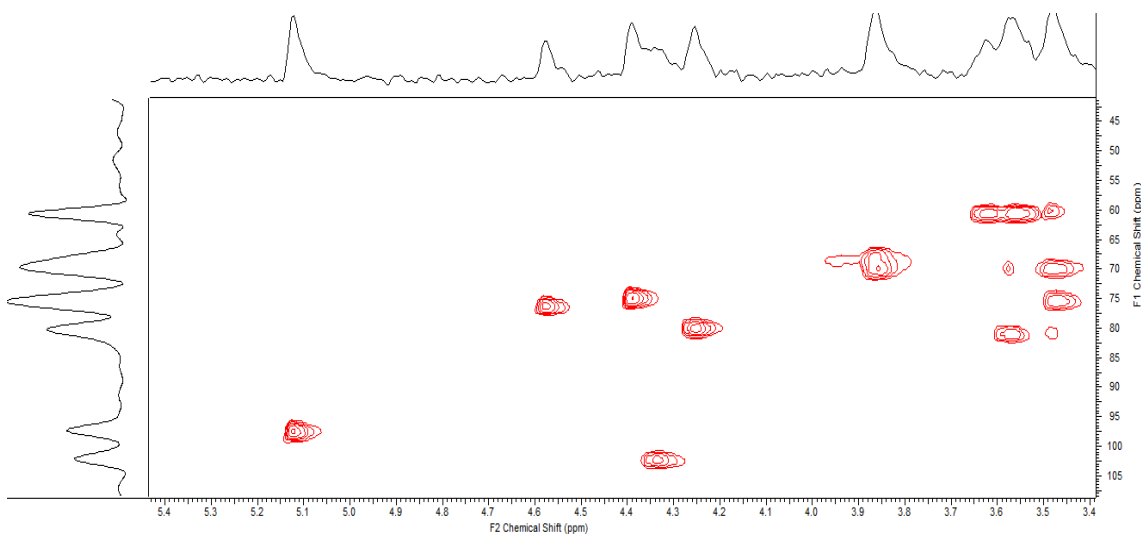


FIGURA 31 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA AMOSTRA 3a

Solvente: $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (70°C); $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ como padrão interno ($\delta = 2,63\text{ppm}$ para ^1H e $42,01\text{ppm}$ para ^{13}C), Van de Velde; Rollema (2008). pH amostra = 7,0

FONTE: O autor (2015)

TABELA 5 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^1H E ^{13}C DAS DIÁDE DE AGAROSE NATIVA E DO DERIVADO C6 AZIDO

^a Deslocamentos químicos (ppm) $^{13}\text{C}/^1\text{H}$							
Amostra	^b Un.	1	2	3	4	5	6
Nativa	G	103,8	71,5	82,6	69,5	76,9	62,2
		4,44	3,58	3,67	3,96	3,57	3,65/3,72
	LA	98,9	71,7	81,6	77,8	76,5	70,2
		5,22	3,96	4,35	4,67	4,48	4,05
Azido	^c G6N ₃	103,9	71,2	82,9	69,8	75,1	52,9
		4,43	3,56	3,66	3,96	3,78	3,49/3,61
	LA	99,1	71,4	81,6	78,3	76,6	70,6
		5,20	3,96	4,35	4,66	4,48	3,95

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: ^a Foi utilizado o solvente $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ como padrão interno ($\delta = 2,63$ e $42,01$ ppm para ^1H e ^{13}C respectivamente, Van de Velde e Rollema (2008) pH amostra = 7,0)

^b Os códigos de letras referem-se à nomenclatura desenvolvida por Knutsen *et al* (1994)

^c G6N₃ = 6-azido-6-desoxi- β -D-galactopiranosose

6.3 SÍNTESE DO DERIVADO AMINO DA AGAROSE

Seguindo a estratégia delineada neste trabalho, a próxima etapa envolveu a redução do grupo azido a amino e obtenção do derivado amino da agarose **4a** e **4b** (FIGURA 11, p. 48). Esta redução é denominada de reação de Staudinger e utiliza a trifenilfosfina e água como reagentes (FOX; EDGAR, 2012). No mecanismo proposto desta reação (FIGURA 32), a adição da trifenilfosfina no meio reacional acarreta a formação de um intermediário fosfazida. Este intermediário ao perder uma molécula de gás nitrogênio, forma um iminofosforano que é então hidrolisado pela água e produz o derivado amino da agarose e óxido de trifenilfosfina.

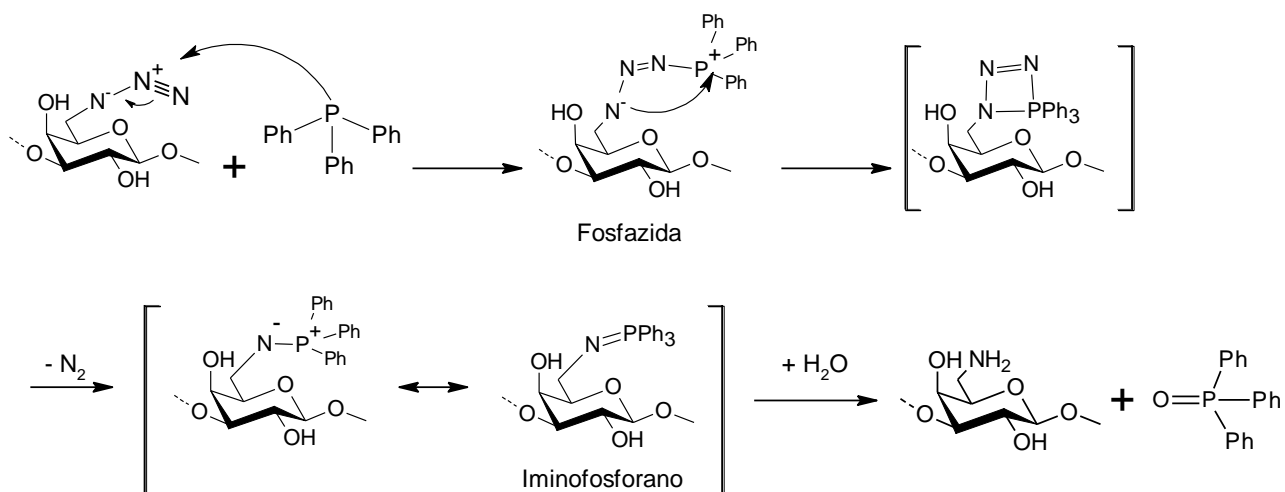
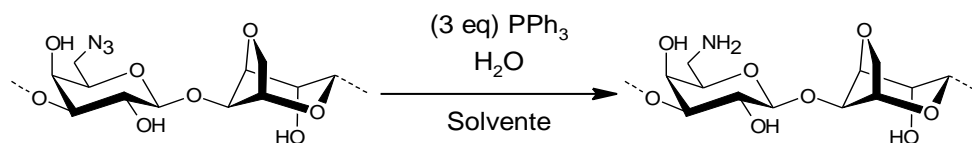


FIGURA 32 - MECANISMO DA REAÇÃO DE STAUDINGER PARA FORMAÇÃO DO DERIVADO AMINO DA AGAROSE

FONTE: Adaptado de Lin *et al.* (2005)

Com base nos estudos de Cimecioglu *et al.* (1994) e Fox e Edgard (2012) que utilizaram a redução de Staudinger para formação de derivados amino da amilose e da celulose respectivamente, partindo do derivado azido destes polissacarídeos foram inicialmente avaliados alguns parâmetros que poderiam influenciar na reação, tais como solvente e tempo de reação (TABELA 6).

TABELA 6 – CONDIÇÕES DE SÍNTESE DO DERIVADO AMINO DA AGAROSE



Entrada	Amostra	Solvente	Tempo (h)	Colorimetria (Ninhidrina)	Rendimento ^a (%)
1 ^b	AGNH1	DMSO	24	Positiva	36
2 ^c	AGNH2	DMF	24	Positiva	80
3 ^b	AGNH3	DMSO	15	Positiva	26

FONTE: O autor (2015)

NOTA: ^a Correspondente à massa do polissacarídeo após purificação

^b Reação realizada com 50 mg de agarose, 50 µL de água e 130 mg de trietilfosfina em 3 mL de DMSO, a 30 °C.

^c Reação realizada com 100 mg de agarose, 100 µL de água e 252 mg de trietilfosfina em 6 mL de DMF, a 30 °C.

Para acompanhar a formação do derivado amino da agarose nas reações foi utilizada a reação colorimétrica da ninhidrina, um método muito utilizado na identificação de aminoácidos (YEMM; COCKING, 1955), que é capaz de identificar preferencialmente aminas primárias. Este teste foi utilizado tanto no polissacarídeo isolado após a reação quanto para acompanhar a evolução da reação enquanto esta ocorria, sendo realizada de tempo em tempo, e observando a formação do produto. A colorimetria para acompanhamento era feita retirando-se alíquotas de 100 μ L do meio reacional (o que continha aproximadamente 1,7 mg de polissacarídeo). A esta quantidade era adicionada solução de ninhidrina em tampão fosfato. Para controle negativo o mesmo procedimento era realizado com 100 μ L de uma solução contendo agarose, trifetilfosfina e água em DMSO ou DMF (nas mesmas proporções da reação). Dessa forma era também avaliado se os reagentes da reação poderiam interferir na colorimetria. Como controle positivo foi utilizada solução de glucosamina. Na figura 33 estão mostrados o acompanhamento para reação da amostra AGNH1 (entrada 1, Tabela 5) através do teste da ninhidrina, onde foi possível observar o surgimento de uma coloração levemente azul/violeta do decorrer da reação (Figura 33 a), indicando a redução do grupamento azido.

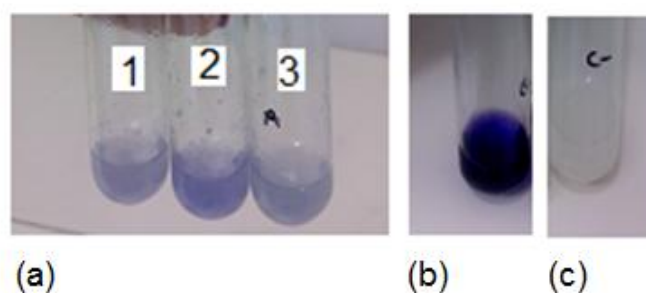


FIGURA 33 – ACOMPANHAMENTO DA REAÇÃO DE REDUÇÃO PELA COLORIMETRIA DA NINHIDRINA.

(a) Amostra AGNH1 após 2 h (1), 4 h (2) e 6 h (3) de reação. (b) Glucosamina (Controle positivo). (c) Agarose nativa (Controle negativo).

FONTE: O autor (2015)

Após a purificação de AGNH1 foi realizado novamente o teste da ninhidrina (FIGURA 34), confirmando a presença do grupamento amino no polissacarídeo. Para confirmar que a presença do derivado azido não poderia dar coloração ao teste, foi realizada também a colorimetria da ninhidrina com o derivado azido **3b**

(FIGURA 35) observando-se que a presença do substrato da reação apresenta resultado negativo para o teste.

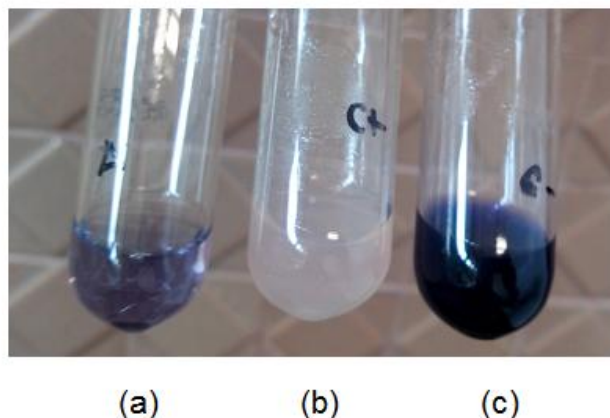


FIGURA 34 – TESTE DA NINHIDRINA PARA A AMOSTRA AGNH1.
(a) Amostra AGNH1 (b) Agarose nativa (Controle negativo). (c) Glucosamina (Controle positivo).
FONTE: O autor (2015)

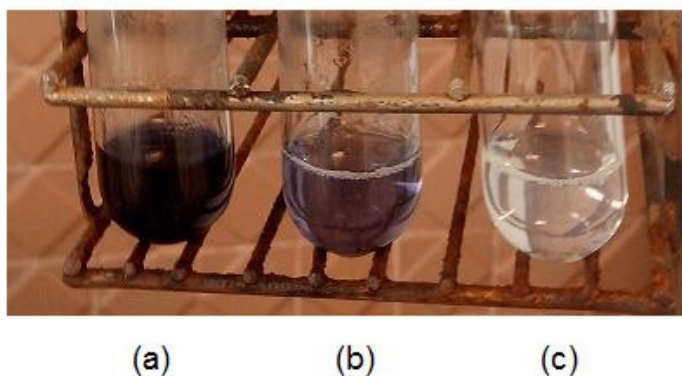


FIGURA 35 – TESTE DA NINHIDRINA PARA A AMOSTRA **3b**.
(a) Glucosamina (Controle positivo) (b) Amostra AGNH3 (c) Amostra **3b**.
FONTE: O autor (2015)

Todas as reações testadas (Tabela 5) se apresentaram positivas para o teste da ninhydrina. A condição escolhida foi a da entrada 2, pois em DMF a precipitação do polissacarídeo se mostrava melhor o que acredita-se que tenha contribuído para uma recuperação maior do polissacarídeo, aumentando-se o rendimento.

Assim, foi realizada a síntese do derivado **4a** numa escala de 5,0 g. O produto foi purificado através da precipitação com etanol e diálise contra água destilada. Já o derivado amino **4b** foi preparado a partir de 1,44 g da agarose azido **3b**. A tentativa de purificação através da precipitação com 3 volumes de etanol para esta amostra foi mal sucedida pois não ocorreu precipitação do polissacarídeo mesmo deixando a solução em *freezer overnight*. Como a solução resultante se apresentava turva foi

realizada uma centrifugação (5000 rpm, 4 °C por 25 minutos), na tentativa de recuperar algum precipitado. Entretanto, esta estratégia foi ineficaz, pois não foi obtida uma massa significativa após a centrifugação. Fox e Edgard (2012) realizaram a purificação do derivado amino da celulose através da diálise contra etanol. Com base nesta informação, a solução turva resultante da síntese **4b** foi dialisada em etanol (4 vezes), sob agitação. Durante a diálise foi observado a formação de um precipitado branco dentro da membrana, similar ao descrito por Fox e Edgard (2012). Após a diálise foi obtido 1,39g do produto.

As reações para obtenção dos produtos **4a** e **4b**, bem como os produtos purificados foram avaliados pela reação colorimétrica da ninhidrina (FIGURA 36), indicando a formação do grupo amino.

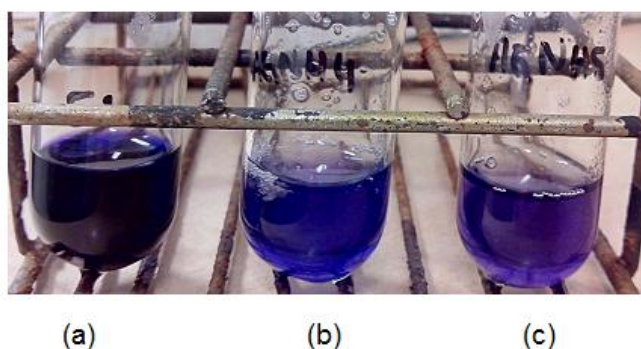


FIGURA 36 - TESTE DA NINHIDRINA PARA OS PRODUTOS **4a** e **4b** APÓS PURIFICAÇÃO.

(a) Glucosamina (Controle positivo) (b) derivado amino **4a** (c) derivado amino **4b**

FONTE: O autor (2015)

A análise por RMN de ^1H dos derivados **4a** e **4b** (FIGURAS 37 e 38 - A) mostrou sinais de grande intensidade na região aromática entre 7,33 e 7,83 ppm. De acordo com o trabalho de Fox e Edgard (2012), estes sinais foram atribuídos à trifenilfosfina e óxido de trifenilfosfina, subproduto formado durante a reação. Buscando a purificação destes produtos, foi adaptada a metodologia utilizada por Fox e Edgard (2012) para remoção dos subprodutos aromáticos utilizando aparelho de soxhlet com etanol como solvente. A purificação foi realizada por 24 horas, para cada amostra. Os materiais sólidos foram secos em capela a temperatura ambiente e liofilizados, gerando por fim 3,8 g (76%) do derivado amino **4a** e 0,0778 g (52%) do

derivado amino **4b**. Após purificação foi realizada novamente a análise de RMN de ^1H (FIGURAS 37 e 38), indicando uma redução significativa do subproduto em **4a** e **4b**, embora esta última amostra ainda tenha apresentado sinais relativos aos derivados de trifenilfosfina e ainda uma quantidade de tosil remanescente.

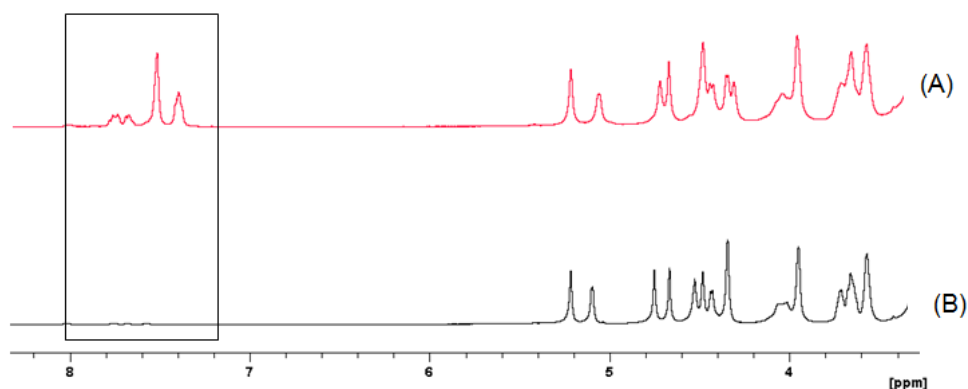


FIGURA 37 –ESPECTROS DE RMN DE ^1H DO DERIVADO AMINO- **4a** ANTES (A) E APÓS PURIFICAÇÃO EM SOHXLET (B)

Solvente: $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (70 °C); $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ como padrão interno ($\delta = 2,63$ ppm para ^1H , Van de Velde; Rollema (2008))

FONTE: O autor (2015)

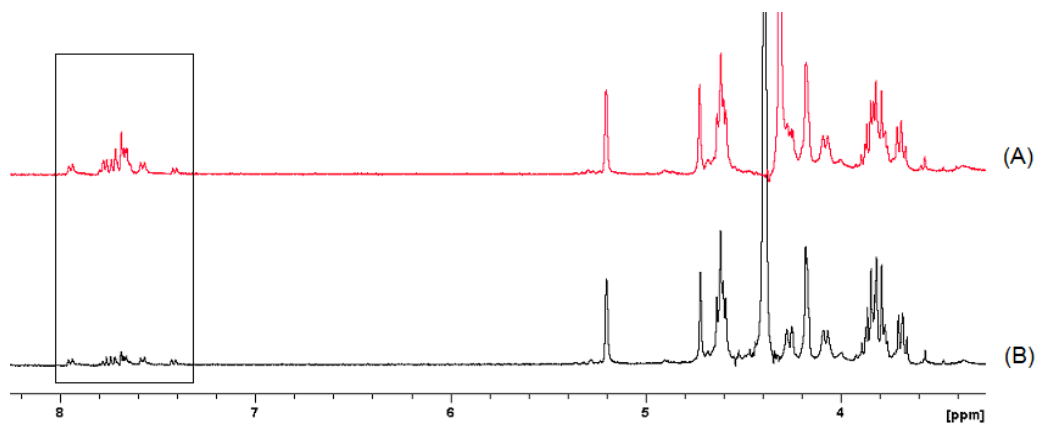


FIGURA 38 –ESPECTROS DE RMN DE ^1H DO DERIVADO AMINO- **4b** ANTES (A) E APÓS PURIFICAÇÃO EM SOHXLET (B)

Solvente: D_2O (70 °C); acetona como padrão interno ($\delta = 2,21$ ppm para ^1H , Van de Velde; Rollema (2008))

FONTE: O autor (2015)

6.3.1 Caracterização química dos derivados amino da agarose **4a** e **4b**

Os produtos **4a** e **4b** sintetizados foram analisados por cromatografia em camada delgada. Para fazer esta análise, foi realizada hidrólise do produto **4b**. A hidrólise foi feita através da adaptação do método descrito por Stevenson e Furneaux (1991), utilizando TFA 2 M a 120 °C por 1,5 horas. Após liofilização, as amostras foram aplicadas em cromatoplaças de sílica gel. Foram utilizadas solução de glucosamina (2 mg/mL) e galactose (2 mg/mL) como padrões. Para revelação dos açúcares aminados foi utilizados solução de ninhidrina, enquanto o orcinol foi utilizado como revelador geral para açúcar. Na figura 39 estão mostrados os resultados para cromatografia em camada delgada da amostra **4b**.

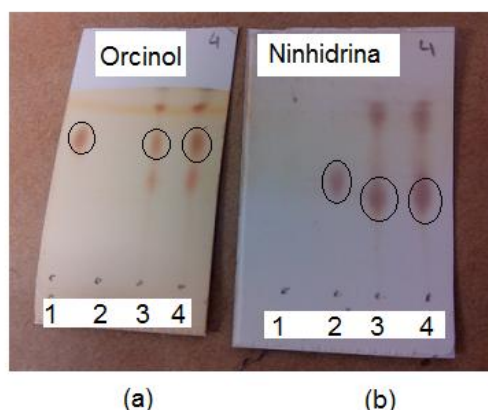


FIGURA 39 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DA AMOSTRA **4b**.

1- padrão de galactose 2- padrão de glucosamina 3- amostra 4b 4- amostra 4b

FONTE: O autor (2015)

É possível observar na revelação com o orcinol (a) uma mancha correspondente a unidade de galactose (indicada em 1, 3 e 4) e na revelação com a ninhidrina (b) uma mancha (em 3 e 4) com Rf próximo ao da glucosamina (2), sugerindo a unidade de galactose que foi aminada no produto.

A amostra **4b** foi submetida a análise por RMN. Inicialmente a amostra foi preparada em (CD₃)₂SO, como todas as anteriores. No entanto, foi observada uma baixa solubilidade. Dessa forma, foi testada a solubilidade em D₂O, que se mostrou ainda pior. Dificuldades de solubilização de polissacarídeos aminados têm sido relatadas na literatura tanto para celulose (FOX; EDGAR, 2012) quanto para amilose

(CIMECIOGLU, 1994). Como estratégia para melhorar a solubilidade do produto e assim obter um espectro de ressonância foram realizados experimentos no laboratório utilizando solução ácida de HCl. Inicialmente, em um vial contendo 10 mg do derivado **4b** foi adicionado 0,5 mL de água e então foi adicionado aos poucos uma solução de HCl de 0,04 M com o objetivo de abaixar o pH e assim protonar o grupo amino, melhorando a solubilidade do produto. Foi observado neste experimento uma queda pequena do pH mesmo adicionando quantidades consideráveis de solução de HCl 0,04 M (pH caía de 7 para 5 após adição de 1 mL da solução que possuía pH=3), provavelmente, devido à um poder tamponante do grupo amino presente na estrutura polissacarídica. Outros testes foram feitos utilizando uma solução de HCl mais concentrada (0,5 M), nestas condições, observou-se uma melhor solubilização do produto em pH abaixo de 4,0. Além disso, foi testada a utilização de uma mistura de solventes deuterados no preparo da amostra. Para 10 mg de amostra foram utilizados as misturas de solventes (CD₃)₂SO com CD₃COOD (0,5 mL e 5 gotas respectivamente) e D₂O com CD₃COOD (0,5 mL e 1 gota respectivamente), com o objetivo de abaixar o pH. No entanto nenhuma das amostras obteve um bom espectro em que fosse possível observar o grupo amino da molécula.

A condição encontrada, em que se conseguiu solubilizar da melhor forma a amostra e obter um bom espectro de RMN, foi a solubilização de 10 mg do produto diretamente em 0,5 mL de solução de HCl 0,5 M. A solução foi preparada deixando-se a amostra sob agitação nesta solução ácida em temperatura ambiente por 2 dias. Em seguida esta amostra foi centrifugada e o sobrenadante liofilizado (restando 5 mg, o que indica que houve solubilização de metade da amostra inicial). Com a amostra liofilizada realizou-se então a solubilização em D₂O, gerando uma solução solúvel de pH 4 que foi enviada para análise de ressonância.

No espectro de RMN de HSQC da amostra **4b**, obtido nestas condições, (FIGURA 40) foi possível observar o desaparecimento da correlação em 3,49 e 3,61/52,9 ppm atribuída a G6 da unidade de 6-azido-6-desoxi- β-D-galactopiranosose e confirmar a entrada do grupo amino na cadeia do polissacarídeo através do aparecimento de uma nova correlação em 3,36/42,9 ppm, atribuída a G6 da unidade de 6-amino-6-desoxi-β-D-galactopiranosose. Em um estudo recente, realizado por Kondaveeti *et al.* (2014) foi feita a síntese da 6-aminoagarose através da reação em microondas deste polissacarídeo com a ftalimida em presença de

azodicarboxilato de diisopropila e trifenilfosfina, seguida de hidrazinólise (FIGURA 7). Os autores caracterizaram a molécula por RMN de ^{13}C e observaram o aparecimento do sinal de G6-amino em 41,5 ppm, muito próximo ao encontrado neste trabalho. No espectro mostrado na figura 40, ainda é observado a correlação de G5 da unidade aminada em 3,95/ 70,9 ppm, o que corrobora com dados encontrados na literatura para aminação de C6 da amilose (CIMECIOGLU *et al.*, 1994).

Para a determinação DS de substituição pelo grupo amino foi utilizado o RMN de ^1H . Para o cálculo foi utilizada a equação abaixo:

$$\text{(Equação 5)} \quad DS_{\text{amino}} = \frac{(G6_{\text{amino}}/2)}{LA1}$$

Em que:

G6 amino= Área do sinal relativo ao prótons H6 da unidade de β -D-galactopiranosose em 3,36 ppm

LA1 = Área do sinal relativo ao próton H1 da unidade de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose em 5,15 ppm

O DS encontrado para a amostra **4b** foi de 0,28, abaixo do calculado para o grau de substituição por grupo azido na amostra **3b** (0,51). No entanto, no espectro de RMN de HSQC da amostra **4b** (FIGURA 40) não se observa a correlação em 3,49 e 3,61/ 52,9 ppm, correspondente a substituição por grupo azido na posição G6 do polissacarídeo, sugerindo que todo o grupo azido foi reduzido a amino nesta posição. Para a amostra **4a**, não foi possível a utilização da fórmula, pois não foi observado o pico na região de 3,36 ppm, bem como a correlação do G6-amino no espectro de HSQC. Acredita-se que isto ocorreu pela baixa substituição pelo grupo azido ($\leq 0,20$), mas houve formação do derivado amino pois a colorimetria da ninhidrina indicou a formação do produto.

Com os dados de RMN de HSQC foi possível então fazer os assinalamentos de ^1H e ^{13}C para a díade amino da agarose, com substituição em G6 (TABELA 7). Na tabela é possível observar alguns deslocamentos das correlações de ^1H e ^{13}C do derivado amino em comparação a agarose nativa, mesmo na unidade de 3,6-anidro-galactopiranosose (LA) que não foi modificada. Isto ocorre, provavelmente devido a diferença de pH das amostras em que os espectros foram obtidos.

Experimentos no laboratório confirmaram que ocorrem pequenos deslocamentos nas correlações de ^1H e ^{13}C no espectro de HSQC quando a mesma amostra é preparada em diferentes pHs.

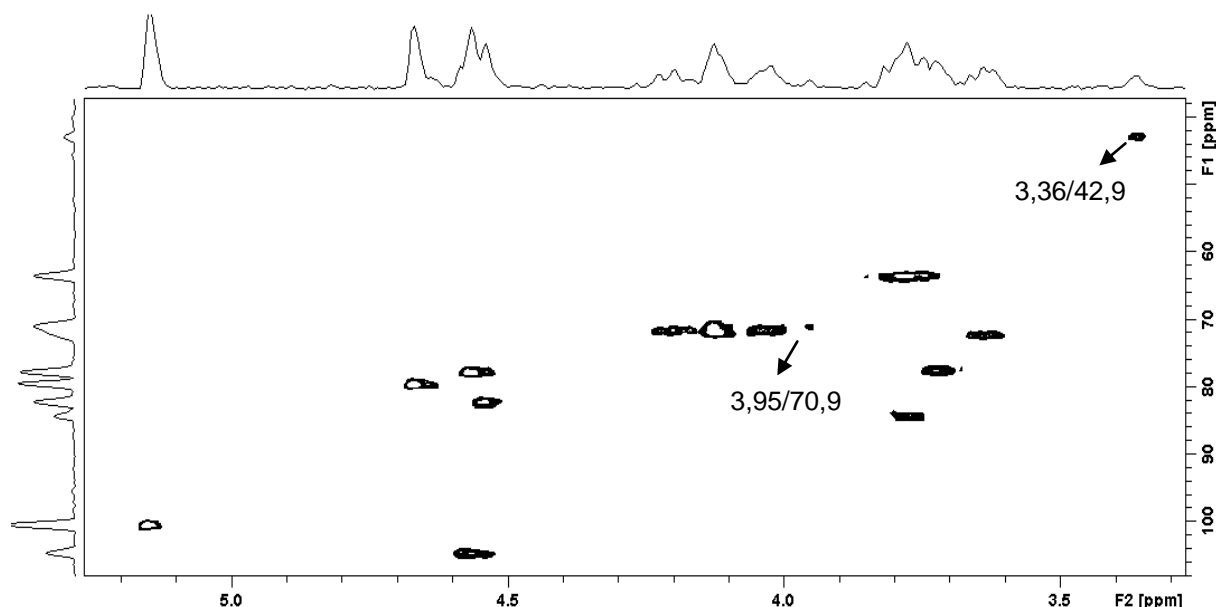


FIGURA 40 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA AMOSTRA **4b**

Solvente: D_2O (70 °C); acetona como padrão interno ($\delta = 2,21$ e $32,69$ ppm para ^1H e ^{13}C), Van de Velde; Rollema (2008). pH amostra = 4,0.

FONTE: O autor (2015)

TABELA 7 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^1H E ^{13}C DAS DÍADES DE AGAROSE NATIVA E DO DERIVADO C6 AMINO

^a Deslocamentos químicos (ppm) $^{13}\text{C}/^1\text{H}$							
Amostra	^b Un.	1	2	3	4	5	6
^d Nativa	G	103,9	71,6	82,6	69,9	76,9	62,3
		4,41	3,54	3,65	3,92	3,56	3,63/3,69
	LA	98,9	71,9	81,7	77,7	76,6	70,3
		5,19	3,94	4,32	4,64	4,47	4,03
^e Amino	^c G6NH ₂	104,5	72,2	84,3	70,9	70,9	42,9
		4,56	3,63	3,77	4,13	3,95	3,36
	LA	100,4	71,7	82,2	79,4	77,7	71,4
		5,15	4,13	4,54	4,67	4,57	4,03/4,20

FONTE: O autor (2015)

NOTA:^a Foi utilizado o padrão interno acetona (2,21 e 32,69 ppm para ^1H e ^{13}C respectivamente, Van de Velde e Rollema (2008))

^b Os códigos de letras referem-se à nomenclatura desenvolvida por Knutsen *et al* (1994).

^c G6NH₂ = 6-amino-6-desoxi- β -D-galactopirranose

^d pH da amostra = 7,0.

^e pH da amostra=4,0.

6.4 SÍNTESE DO DERIVADO AMINO CARBOXILADO DA AGAROSE

A utilização do reagente de oxidação TEMPO (*N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina) tem sido apontada como um método seletivo, eficiente e bem controlado para oxidar hidroxilas primárias de polissacarídeos (EVIER *et al.*, 1995; PEREZ *et al.*, 2003; KATO *et al.*, 2003; BRAGD *et al.*, 2004). Este reagente apresenta diversas vantagens a saber sua alta taxa de reação e regiosseletividade. Como este reagente faz parte da classe de compostos nitroxil ou radical nitróxido, ele pode ser regenerado durante a reação na presença de um co-oxidante e por isso pode ser adicionado em quantidades catalíticas no meio reacional (ANGELIN *et al.*, 2006).

O reagente TCCA (ácido triclorohisocianúrico) é um oxidante brando, simples e seguro, de baixo custo e em condições alcalinas pode ser utilizado em reações de oxidação (TILSTAM; WEINMANN, 2002). Reações de oxidação utilizando TEMPO e TCCA se mostram interessantes uma vez que o TCCA utilizado atua reciclando o TEMPO adicionado na reação (FIGURA 41). O mecanismo desta processo consiste na reação de uma quantidade catalítica de TCCA com o reagente TEMPO para formar íon *N*-oxoamônio (**6**). Este intermediário então oxida o álcool ao composto carbonila correspondente gerando a hidroxilamina (**7**). Esta, por sua vez, é oxidada pelo TCCA gerando novamente o derivado oxoamônio (**6**). Por fim, a hidrólise lenta do TCCA ou seus derivados forma ácido hipocloroso capaz de oxidar o aldeído a ácido carboxílico (LUCA *et al.*, 2003).

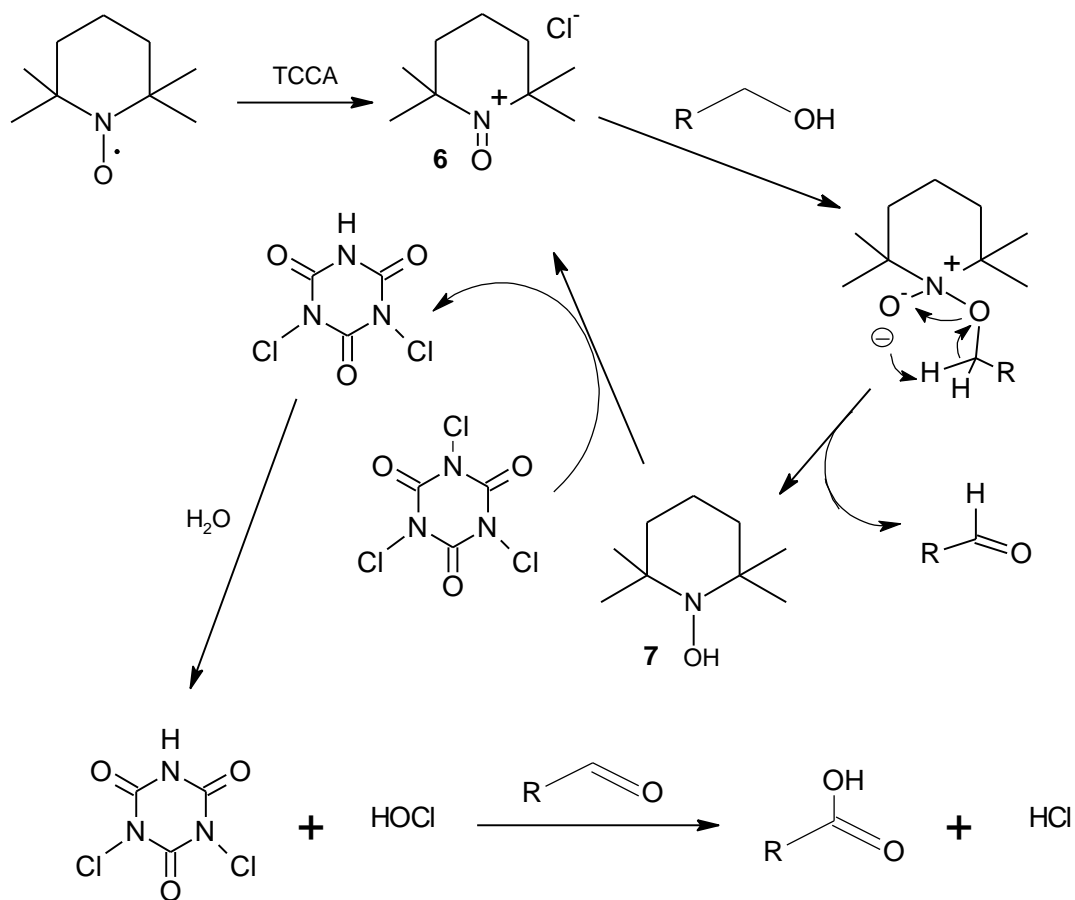
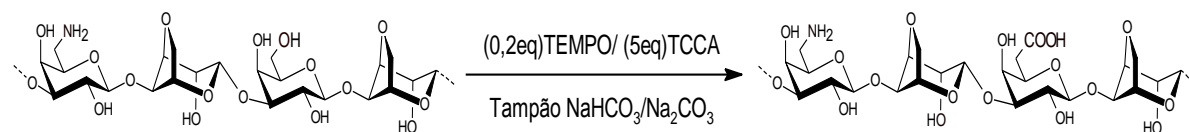


FIGURA 41 – MECANISMO DE REAÇÃO UTILIZANDO OS REAGENTES TEMPO E TCCA.

FONTE: Adaptado de Luca *et al.* (2003)

Assim, o derivado amino da agarose sintetizado **4** foi submetido à uma reação de oxidação seletiva, utilizando o reagente de oxidação TEMPO e o co-oxidante TCCA. As reações foram realizadas com base nos estudos de Jiang *et al.* (2000); Perez *et al.* (2003); Kato *et al.* (2003); Su *et al.* (2013) e Santos (2015). Para esta reação foram realizadas três otimizações, utilizando a amostra **4a**, em que foram avaliados os parâmetros tempo e temperatura da reação (TABELA 8).

TABELA 8 – OTIMIZAÇÃO DA OXIDAÇÃO SELETIVA DO DERIVADO AMINO DA AGAROSE



Entrada	Amostra	Tempo (h)	Temperatura (°C)	RMN ^d (%)	Dosagem urônico (%)	Rendimento ^a (%)
1 ^b	AGOX1	18h	30	100%	33,8	45
2 ^b	AGOX2	6h	30	100%	36,5	49
3 ^c	AGOX3	18h	^e Banho gelo/ 20°C	100%	42,9	47

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: ^a Correspondente à massa do polissacarídeo após purificação.

^b Reação realizada com 150 mg de agarose e 15,3 mg de TEMPO, 569 mg de TCCA em 150 mL de tampão pH 9,5 NaHCO₃/Na₂CO₃, a 30°C.

^c Reação realizada com 150 mg de agarose e 15,3 mg de TEMPO, 569 mg de TCCA em 150 mL de tampão pH 9,5 NaHCO₃/Na₂CO₃, a 0°C.

^d Observado por RMN de HSQC.

^e Reação realizada nas primeiras horas em banho de gelo e em seguida deixada a temperatura ambiente de 20 °C.

Ao fim de todas as reações foi adicionado etanol, que ao reagir com o TCCA é capaz de parar a reação e então foi adicionado NaBH₄ com o objetivo de evitar a formação de aldeído (intermediário da reação) e também a degradação do produto.

Para acompanhar a formação do derivado carboxilado foi utilizado o método colorimétrico para determinação de ácido urônico. A dosagem de ácido urônico foi realizada pelo método descrito por Filisetti-Cozzi e Carpita (1991). A quantificação foi realizada com o auxílio de uma curva padrão de ácido galacturônico, onde se obtinha a porcentagem em massa de ácido urônico presente na unidade dissacarídica.

A análise da tabela de otimização mostra que nos diferentes tempos e temperaturas os resultados encontrados foram muito similares. O rendimento de recuperação do polissacarídeo ficou em uma média de 47% e em todos os casos foi observado 100% de oxidação das hidroxilas livres, por RMN de HSQC. A condição escolhida para síntese dos produtos em escala preparativa foi a da entrada 3, pois acreditava-se que a menor temperatura seria melhor para reação, uma vez que o oxidante TEMPO é instável a temperaturas maiores. Além disso, como o meio da

reação era alcalina temperaturas maiores poderiam favorecer a despolimerização do polissacarídeo. Assim, foram sintetizados os derivados **5a** e **5b** da agarose. O esquema da síntese está representado na figura 11, p. 48.

6.4.1 Caracterização química dos derivados amino e carboxilado da agarose **5a** e **5b**

A espectroscopia de infravermelho da amostra **5a** (FIGURA 42) mostrou uma banda em 1596 cm^{-1} correspondente ao estiramento simétrico -COO^- (SU *et al.*, 2013), confirmando a oxidação da molécula.

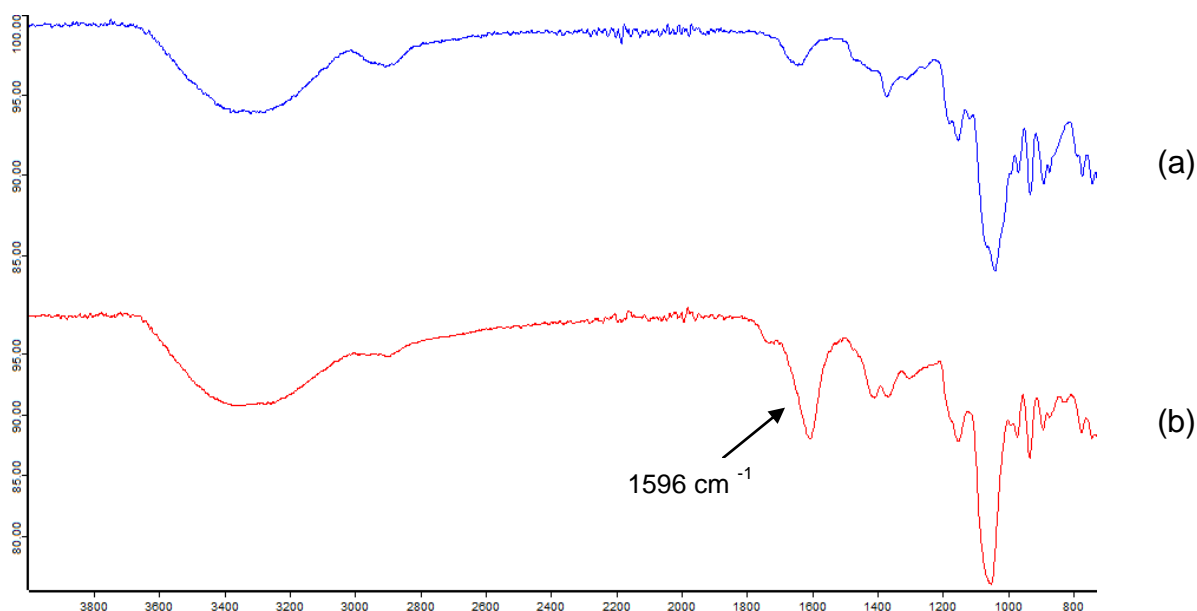


FIGURA 42 - ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DAS AMOSTRAS AGAROSE REDUZIDA (a) e AMOSTRA **5a** (b)

Região entre $4000\text{-}800\text{ cm}^{-1}$

FONTE: O autor (2015)

Para a análise por cromatografia em camada delgada foi realizada hidrólise dos polissacarídeos. Esta hidrólise foi feita através da adaptação do método descrito por Stevenson e Furneaux (1991). Na figura 43 estão mostrados os resultados para cromatografia em camada delgada da amostra **5a**. É possível observar na linha da amostra **5a** (4) uma mancha com o R_f próximo ao apresentado pela galactose (1), e outra mancha com R_f próximo ao apresentado pelo ácido galactourônico (2), sugerindo a presença deste ácido no polissacarídeo.



FIGURA 43 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DA AMOSTRA **5a** HIDROLISADA.

1- padrão de galactose. 2- padrão de ácido galacturônico. 3- padrão de galactosamina. 4- amostra **5a**
 FONTE: O autor (2015)

No espectro de RMN de HSQC da amostra **5a** (FIGURA 44), foi observado que a correlação correspondente ao remanescente de G6 da unidade de β -D-galactopirranose em 3,65 e 3,72/62,2 ppm desaparece, indicando a oxidação completa (100%) das hidroxilas primárias. Ainda é possível observar o deslocamento da correlação de G5, de 3,67/76,9 ppm para 4,04/77,9 ppm e de G4 de 3,96/69,5 ppm para 4,40/72,2 ppm, devido a transformação da unidade de β -D-galactopirranose em β -D-galactopiranosidurônico.

No espectro da amostra **5b** (FIGURAS 45 – a) também é possível observar o desaparecimento da correlação correspondente ao G6, indicando que houve 100% de oxidação. Para esta amostra, preparada em pH 2 (FIGURA 45 - a), é possível observar ainda o sinal correspondente ao G6 da unidade 6-amino-6-desoxi- β -D-galactopirranose em 3,36/42,9 ppm. No entanto falta a correlação correspondente à G3 neste espectro e G2 aparece muito fracamente. Dessa forma esta mesma amostra foi preparada em pH 4,0 para visualização destas correlações faltantes, que apareceram em 3,72/74,1 para G2 e 3,83/83,3 para G3 (FIGURA 45 - b), entretanto neste pH não foi possível a visualização do grupo amino. Estes resultados, ressaltaram a importância do pH para visualização deste grupo, além da influência do pH de preparo da amostra para o aparecimento de correlações $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ do polissacarídeo modificado.

A partir dos espectros de RMN obtidos da amostra **5a** foi então possível propor uma tabela de assinalamento para a díade oxidada da agarose (GU) (TABELA 9).

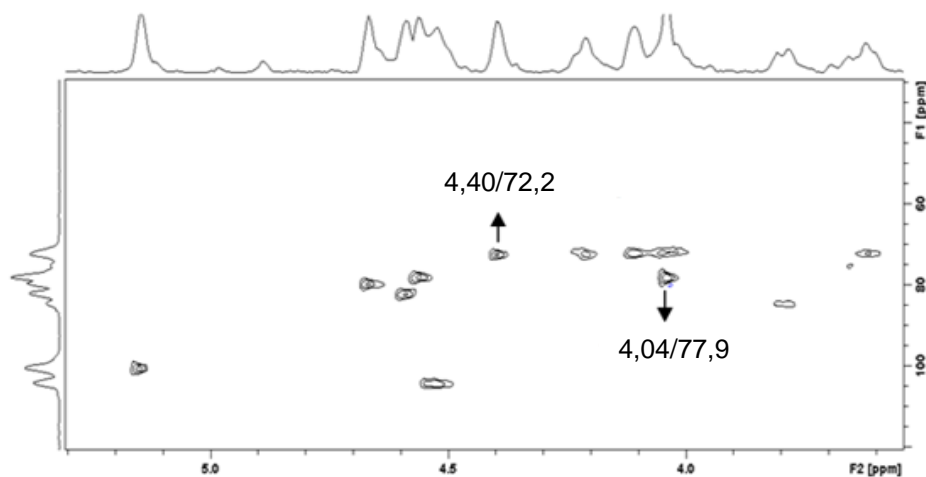


FIGURA 44 - ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA AMOSTRA 5a

Solvente: D₂O (70°C); acetona como padrão interno ($\delta = 2,21$ e $32,69$ ppm para ^1H e ^{13}C), Van de Velde; Rollema (2008). pH amostra = 4,0.

FONTE: O autor (2015)

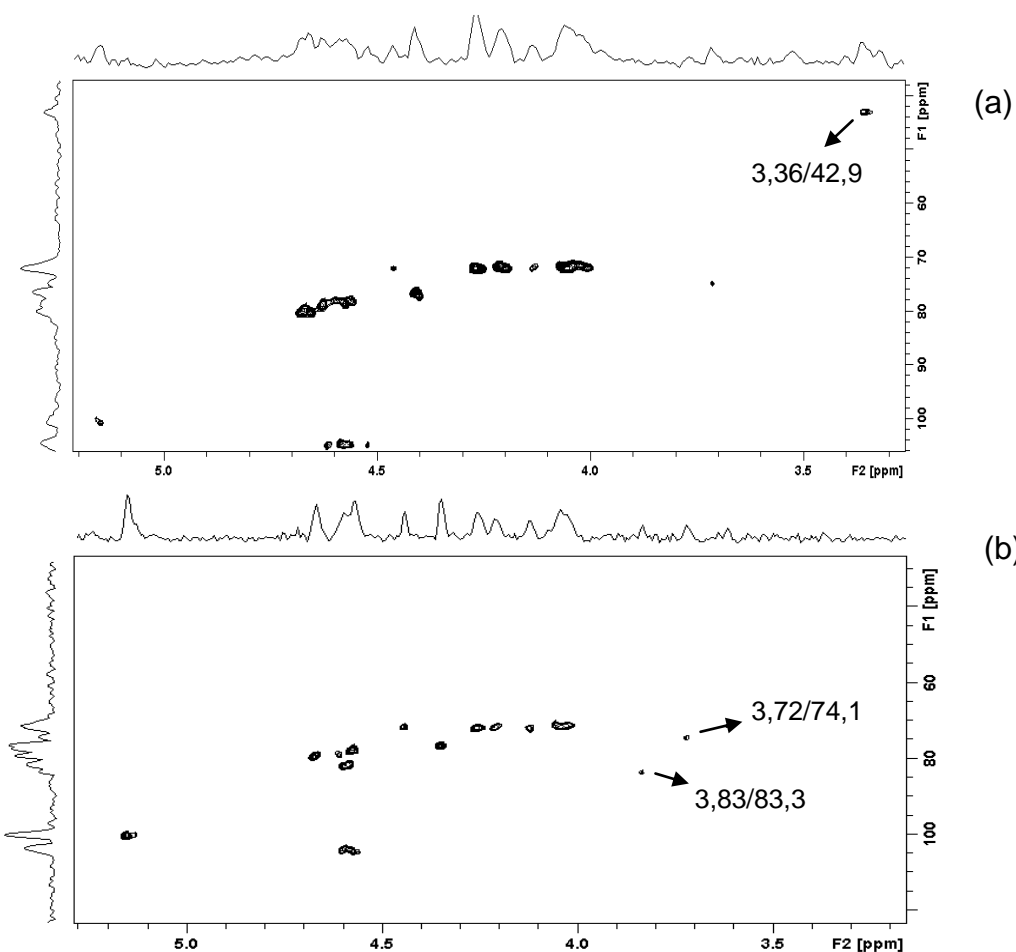


FIGURA 45 - ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA AMOSTRA 5b

(a) Amostra em pH 2,0; (b) amostra em pH 4,0

Solvente: D₂O (70°C); acetona como padrão interno ($\delta = 2,21$ e $32,69$ ppm para ^1H e ^{13}C), Van de Velde; Rollema (2008).

FONTE: O autor (2015)

TABELA 9 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^1H E ^{13}C DAS DIADES DE AGAROSE NATIVA E OXIDADA EM C6

^a Deslocamentos químicos (ppm) $^{13}\text{C}/^1\text{H}$							
Amostra	^b Un.	1	2	3	4	5	6
^c Nativa	G	103,9	71,6	82,6	69,9	76,9	62,3
		4,41	3,54	3,65	3,92	3,56	3,63/3,69
	LA	98,9	71,9	81,7	77,7	76,6	70,3
		5,19	3,94	4,32	4,64	4,47	4,03
^d Oxidada	^e GU	104,0	71,9	84,5	72,2	77,9	^f n.d
		4,53	3,62	3,78	4,40	4,04	
	LA	100,5	71,8	81,9	79,6	78,0	69,5
		5,15	4,11	4,58	4,67	4,57	4,07 /4,26

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: ^a Foi utilizado o padrão interno acetona (2,21 e 32,69 ppm para ^1H e ^{13}C respectivamente, Van de Velde e Rollema (2008))

^b Os códigos de letras referem-se à nomenclatura desenvolvida por Knutsen *et al* (1994).

^c pH da amostra = 7,0.

^d pH da amostra=4,0, assinalamento baseado nos espectros de 5a.

^e GU = β -D-galactopiranosidurônico

^f n.d = Não detectado

Os resultados de oxidação seletiva para o derivado amino da agarose foram muito bem sucedidos, ocorrendo 100% de oxidação das hidroxilas livres em G6. Su *et al*. (2013) realizaram um estudo de oxidação da agarose, para posterior ligação à dopamina. Segundo os autores a carboxilação de materiais pode efetivamente aumentar suas propriedades de superfície e favorecer a ligação, proliferação e diferenciação celular, além disso, as carboxilas são grupos ativos que reagem facilmente com outros grupos por adsorção eletrostática ou reação química. Estes autores realizaram a oxidação da agarose em um sistema utilizando TEMPO, NaBr e NaClO, o pH foi mantido em 10,5 pela adição de 1 M de solução de NaOH. A reação foi realizada a temperatura ambiente por 2 h e nestas condições otimizadas os autores alcançaram um valor máximo de 30% de oxidação. Dessa forma o presente trabalho demonstra o sucesso da utilização do sistema TEMPO/TCCA em tampão carbonato para oxidação da agarose.

7 CONCLUSÃO

No presente trabalho foram sintetizados os derivados tosil, azido, amino e carboxila da agarose a partir de uma rota sintética constituída de 4 reações. Todas as reações foram otimizadas para obtenção dos produtos em escala preparativa, e estes polissacarídeos foram caracterizados por diferentes métodos químicos e espectroscópicos.

O derivado tosil da agarose foi sintetizado com alto rendimento (97%) em meio aquoso básico e apresentou alto grau de substituição ($DS = 0,91$). A etapa de retosilação mostrou-se muito interessante, pois foi obtido um bom rendimento e a substituição por grupo tosila nas hidroxilas de G6, G4 e LA2. A substituição na posição G6 foi preferencial, com um $DS = 0,57$.

O derivado azido da agarose foi sintetizado por uma reação de substituição nucleofílica de segunda ordem utilizando azida de sódio e apresentou bons rendimentos, 84% para **3a** e 52% para **3b**. O valor do DS (0,50) para o grupo azido em conjunto com os dados de espectrometria da amostra **3b** indicaram a substituição preferencial em G6.

O derivado amino foi sintetizado através da reação de Staudinger, utilizando a trifenilfosfina e água. A reação se mostrou mais trabalhosa, apresentando dificuldades na recuperação do polissacarídeo do meio reacional. Este problema foi solucionado pela diálise contra etanol e extração utilizando aparelho de Soxhlet, a qual se mostrou muito bem sucedida.

Este derivado apresentou solubilidade muito ruim nos diferentes solventes testados, dificultando a caracterização do produto por RMN de HSQC. Para visualização do grupo amino em G6 por esta técnica, a amostra foi preparada fazendo-se uma solubilização prévia em solução ácida de HCl, o que provavelmente levou a protonação do grupo amino, melhorando a solubilidade do composto. O pH abaixo de 4,0 se mostrou essencial para a visualização do grupo químico de interesse. A análise dos espectros de RMN indicou que todo o grupo tosil na posição G6 foi convertido a azida e então reduzido a amina.

O derivado amino carboxilado, foi sintetizado com os reagentes TEMPO/TCCA promovendo a oxidação seletiva das hidroxilas de G6 não substituídas. Os resultados indicaram 100% de oxidação das hidroxilas e

aproximadamente 50% de recuperação do polissacarídeo, apesar da dificuldade de solubilização do produto. O produto sintetizado apresentou uma solubilidade muito melhor em comparação ao derivado amino, apesar de ainda não ser totalmente solúvel em água, mesmo em baixas concentrações.

O principal desafio encontrado no trabalho foi a solubilidade dos produtos. A agarose é um polissacarídeo difícil de modificar devido principalmente à suas propriedades físico-químicas, no entanto, bons resultados de modificação química foram alcançados. Além disso os derivados sintetizados apresentam um grande potencial no desenvolvimento de materiais com aplicação tecnológica e farmacêutica.

REFERÊNCIAS

ANGELIN, M.; HERMANSSON, M.; DONG, H.; RAMSTRÖM, O. Direct, Mild, and Selective Synthesis of Unprotected Dialdo-Glycosides. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2006, n. 19, p. 4323–4326, 2006.

ARAKI, C. Some recent studies on the polysaccharides of agarophytes. **Journal of Applied Phycology**, v.7, 231-243, 1966.

ARAÚJO, C. A DE; NOSEDA, M. D.; CIPRIANI, T. R.; GONÇALVES, A. G.; DUARTE, M. E. R.; DUCATTI, D. R. B. Selective sulfation of carrageenans and the influence of sulfate regiochemistry on anticoagulant properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 2, p. 483–91, 2013.

ASPINALL, G. O. Chemical characterization and structure determination of polysaccharides. In: **The polysaccharides**, v.1, p. 2330-2338, 2011.

BALLESTEROS, A.; MONTERO, J. M. S.; SINISTERRA, J. V. p-Toluenesulfonyl chloride activation of agarose as exemplified by the coupling of lysine and micrococcal endonuclease. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 38, p. 227–236, 1986.

BRAGD, P. L.; BEKKUM, H. VAN; BESEMER, A. C. TEMPO-mediated oxidation of polysaccharides : survey of methods and applications. **Topic in Catalysis** , v. 27, n. February, 2004.

BRESOLIN, I. T. L.; BORSOI-RIBEIRO, M.; CARO, J. R.; *et al* . Adsorption of human serum proteins onto TREN-agarose: purification of human IgG by negative chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 877, n. 1-2, p. 17–23, 2009.

BOLD, H.C.; WYNNE, M.J. **Introduction to the Algae**. Englewood Cliffs, N.J: Prentice-Hall, 1985. 720p.

CAMPO, V. L.; KAWANO, D. F.; SILVA, D. B. DA; CARVALHO, I. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 2, p. 167–180, 2009.

CHHATBAR, M. U.; GODIYA, C. B.; SIDDHANTA, A. K. Functional modification of agarose: A facile synthesis of an agarose-saccharate derivative. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 3, p. 1118–1123, 2012.

DAS, B.; REDDY, V. S.; REDDY, M. R. An efficient and selective tosylation of alcohols with p-toluenesulfonic acid. **Tetrahedron Letters**, v. 45, n. 36, p. 6717–6719, 2004.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

ELCHINGER, P.-H.; FAUGERAS, P.-A.; BOËNS, B.; *et al.* Polysaccharides: The “Click” Chemistry Impact. **Polymers**, v. 3, n. 4, p. 1607–1651, 2011.

EVIER, E. I.; NOOY, A. E. J. DE; BESEMER, A. C.; BEKKUM, H. VAN. Highly selective nitroxyl radical-mediated oxidation of primary alcohol groups in water-soluble glucans. **Carbohydrate Research**, v. 269, p. 89–98, 1995.

FILISSETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, v. 197, p. 157–162, 1991.

FOX, S. C.; EDGAR, K. J. Staudinger Reduction Chemistry of Cellulose: Synthesis of Selectively O-Acylated 6-Amino-6deoxy-cellulose. **Biomacromolecules**, v. 13, p. 992–1001, 2012.

GAGGINI, F.; PORCHEDDU, A.; REGINATO, G.; RODRIQUEZ, M.; TADDEI, M. Colorimetric tools for solid-phase organic synthesis. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 6, n. 5, p. 805–10, 2004.

GAMINI, A.; TOFFANIN, R.; MURANO, E.; RIZZO, R. Hydrogen-bonding and conformation of agarose in methyl sulfoxide and aqueous solutions investigated by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 304, n. 3-4, p. 293–302, 1997.

GARCIA, R. B.; VIDAL, R. R. L.; RINAUDO, M. Preparation and structural characterization of O-acetyl agarose with low degree of substitution. **Polímeros**, v. 10, p. 155–161, 2000.

GERICKE, M.; SCHALLER, J.; LIEBERT, T.; *et al* . Studies on the tosylation of cellulose in mixtures of ionic liquids and a co-solvent. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 2, p. 526–536, 2012.

GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; MÉNDEZ, J. A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, M.; VÁZQUEZ, B.; SAN ROMÁN, J. Oxidized dextrans as alternative crosslinking agents for polysaccharides: application to hydrogels of agarose-chitosan. **Acta biomaterialia**, v. 10, n. 2, p. 798–811, 2014.

GRAHAM, L. E.; WILCOX, L. W. **Algae**. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 2000. 640p.

HASEGAWA, T.; UMEDA, M.; NUMATA, M.; *et al* . “Click chemistry” on polysaccharides: a convenient, general, and monitorable approach to develop (1-->3)-beta-D-glucans with various functional appendages. **Carbohydrate Research**, v. 341, n. 1, p. 35–40, 2006.

HERNANDEZ, K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Control of protein immobilization: coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 2, p. 107–22, 2011.

HEINZE, T.; TALABA, P.; HEINZE, U. Starch derivatives of high degree of functionalization . 1 . Effective , homogeneous synthesis of p -toluenesulfonyl (tosyl) starch with a new functionalization pattern. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, p. 411–420, 2000.

JIANG, B.; DROUET, E.; MILAS, M.; RINAUDO, M. Study on TEMPO-mediated selective oxidation of hyaluronan and the effects of salt on the reaction kinetics. **Carbohydrate Research**, v. 327, n. 4, p. 455–61, 2000.

JIAO, G.; YU, G.; ZHANG, J.; EWART, H. S. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. **Marine drugs**, v. 9, n. 2, p. 196–223, 2011.

JIE, Y.; ZHANG, L.; CHEN, P.; MAO, X.; TANG, S. Preparation of agarose sulfate and its antithrombogenicity. **Journal of Wuhan University of Technology-Mater**, v. 27, n. 1, p. 110–114, 2012.

KATO, Y.; MATSUO, R.; ISOGAI, A. Oxidation process of water-soluble starch in TEMPO-mediated system. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, n. 1, p. 69–75, 2003.

KNUTSEN, S.H.; MYSLABODSKI, D.E.; LARSEN, B.; USOV, A.I. A modified system of nomenclature for red algal galactans. **Botanica Marina**, v. 37, p. 163–169, 1994

KOLENDER, A. A; MATULEWICZ, M. C. Desulfation of sulfated galactans with chlorotrimethylsilane. Characterization of beta-carrageenan by ¹H NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 9, p. 1619–29, 2004.

KONDAVEETI, S.; PRASAD, K.; SIDDHANTA, A K. Functional modification of agarose: a facile synthesis of a fluorescent agarose-tryptophan based hydrogel. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, n. 1, p. 165–71, 2013. Elsevier Ltd.

KONDAVEETI, S.; MEHTA, G. K.; SIDDHANTA, A K. Modification of agarose: 6-Aminoagarose mediated syntheses of fluorogenic pyridine carboxylic acid amides. **Carbohydrate polymers**, v. 106, p. 365–73, 2014

KURITA, K. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. **Progress in Polymer Science**, v. 26, n. 9, p. 1921–1971, 2001.

LIN, F. L.; HOYT, H. M.; HALBEEK, H.; BERGMAN, R. G.; BERTOZZI, C. R. Mechanistic Investigation of the Staudinger Ligation. **Journal of the American Chemical Society**, v.127, p.2686-2695, 2005.

LIU, C.; BAUMANN, H. Exclusive and complete introduction of amino groups and their N-sulfo and N-carboxymethyl groups into the 6-position of cellulose without the use of protecting groups. **Carbohydrate research**, v. 337, n. 14, p. 1297–307, 2002.

LUCA, L. DE; GIACOMELLI, G.; MASALA, S.; PORCHEDDU, A.; CHIMICA, D. Trichloroisocyanuric / TEMPO Oxidation of Alcohols under Mild Conditions : A Close Investigation. **Journal of Organic Chemistry** , v. 68, n. 12, p. 4999–5001, 2003.

LUTZ, J.-F.; ZARAFSHANI, Z. Efficient construction of therapeutics, bioconjugates, biomaterials and bioactive surfaces using azide-alkyne “click” chemistry. **Advanced drug delivery reviews**, v. 60, n. 9, p. 958–70, 2008.

MEENA, R.; SIDDHANTA, A. K.; PRASAD, K.; *et al* . Preparation, characterization and benchmarking of agarose from Gracilaria dura of Indian waters. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 1, p. 179–188, 2007.

MORITA, Y.; SUGAHARA, Y.; TAKAHASHI, A.; IBONAI, M. Preparation of chitin-p-toluenesulfonate and deoxy(thiocyanato)chitin. **Pergamon**, v. 30, n. 11, p. 1231–1236, 1994.

NILSSON, K.; MOSBACH, K. p-Toluenesulfonyl chloride as an activating agent of agarose for the preparation of immobilized affinity ligands and proteins. **European journal of biochemistry**, v. 112, n. 2, p. 397–402, 1980.

OZA, M. D.; MEENA, R.; PRASAD, K.; PAUL, P.; SIDDHANTA, A. K. Functional modification of agarose: A facile synthesis of a fluorescent agarose–guanine derivative. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 4, p. 878–884, 2010.

OZA, M. D.; MEENA, R.; SIDDHANTA, A. K. Facile synthesis of fluorescent polysaccharides: Cytosine grafted agarose and κ-carrageenan. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 3, p. 1971–1979, 2011.

PAINTER, T.J. In: Aspinall GO, editor. **The polysaccharides**. v.2, New York: Academic Press, 1983, p. 195.

RATNER, D. M.; ADAMS, E. W.; DISNEY, M. D.; SEEBERGER, P. H. Tools for glycomics: mapping interactions of carbohydrates in biological systems. **ChemBiochem : a European journal of chemical biology**, v. 5, n. 10, p. 1375–83, 2004.

RENN, D. W. Agar and Agarose : Indispensable Partners in Biotechnology. **Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development**, v. 23, p. 17–21, 1984.

ROSTOVTSEV, V. V.; GREEN, L. G.; FOKIN, V. V.; SHARPLESS, K. B. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective “ligation” of azides and terminal alkynes. **Angewandte Chemie**, v. 41, n. 14, p. 2596–9, 2002.

SANTOS, G. C. dos; **Oxidação seletiva de carragenanas utilizando o reagente TEMPO e o ácido tricloroisocianúrico como co-oxidante**. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

SASSAKI, G. L.; RITER, D. S.; SANTANA FILHO, A. P.; *et al* . A robust method to quantify low molecular weight contaminants in heparin: detection of tris(2-n-butoxyethyl) phosphate. **The Analyst**, v. 136, p. 2330–2338, 2011.

SILVERSTEIN, M. R.; BASSLER, C. G.; MORRIL, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 5^a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

SPAGNA, G.; BARBAGALLO, R. N.; GIORGIO, P.; MARIA, R.; GUISAN, M. Stabilization of α b -glucosidase from *Aspergillus niger* by binding to an amine agarose gel. **Journal of Molecular Catalysis** , p. 63–69, 2000.

STEVENSON, R. J.; BOTHWELL, M.L.; LOWE, R.L. **Algal Ecology - Freshwater Benthic Ecosystems**. San Diego: Academic Press, 1996. 753p.

STEVENSON, T. T; FURNEAUX, R.H. Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae. **Carbohydrate Research**, p. 277-298, 1991.

STORTZ, C. A.; CEREZO, A. S. Novel findings in carrageenans, agaroids and "hybrid" redseaweed galactans. **Current Topics in Phytochemistry**, v. 4, p. 121-134, 2000.

SU, Y.; CHU, B.; GAO, Y.; *et al* . Modification of agarose with carboxylation and grafting dopamine for promotion of its cell-adhesiveness. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 2245–51, 2013.

TAVANO, O. L.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GOULART, A. J.; MONTI, R. Optimization of the immobilization of sweet potato amylase using glutaraldehyde-agarose support. Characterization of the immobilized enzyme. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 7, p. 1054–1058, 2013.

TILSTAM, U.; WEINMANN, H. Trichloroisocyanuric Acid : A Safe and Efficient Oxidant. **Organic Process Research & Development**, v. 6, n. 4, p. 384–393, 2002.

USOV, A. I. NMR Spectroscopy of Red Polysaccharides: Agars, Carragenans, and Xylans. **Botanica Marina**, v.27, p. 189-202, 1984.

VAN DE VELDE, F.; KNUTSEN, S. H.; USOV, A. I.; ROLLEMA, H. S.; CEREZO, A. S. ^1H and ^{13}C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. **Trends in Food Science & Technology**, v.13, p.73-92, 2002

VIEIRA, M. F.; VIEIRA, A. M. S.; ZANIN, G. M.; *et al* . β -Glucosidase immobilized and stabilized on agarose matrix functionalized with distinct reactive groups. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, n. 1-2, p. 47–53, 2011.

VOET, D.; VOET, J.G. **Bioquímica**. 4^a edição. Porto Alegre: Artmed, 2013. 1481p.

WANG, T.-P.; CHANG, L.-L.; CHANG, S.-N.; *et al* . Successful preparation and characterization of biotechnological grade agarose from indigenous *Gelidium amansii* of Taiwan. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 550–554, 2012.

YEMM, E.W.E; COCKING, E.C. The Determination of Amino-Acid with Ninhydrin. **Analytical Biochemistry**, v.80, p.209-213,1955.

ZAMPANO, G.; BERTOLDO, M.; CIARDELLI, F. Defined Chitosan-based networks by C-6-Azide–alkyne “click” reaction. **Reactive and Functional Polymers**, v. 70, n. 5, p. 272–281, 2010.

ZHAO, Y.; HE, J.; HAN, X.; *et al* . Modification of hydroxypropyl guar gum with ethanolamine. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 2, p. 988–92, 2012.